

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

На правах рукописи

КОЛОБОВА ЕКАТЕРИНА АЛЕКСЕЕВНА

**ИМИДАЗОЛИЕВЫЕ ИОННЫЕ ЖИДКОСТИ
В КАЧЕСТВЕ ЭКСТРАГЕНТОВ, МОДИФИКАТОРОВ КВАРЦЕВОГО
КАПИЛЛЯРА И ХИРАЛЬНЫХ СЕЛЕКТОРОВ В КАПИЛЛЯРНОМ
ЭЛЕКТРОФОРЕЗЕ**

Специальность 02.00.02 – АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

**Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата химических наук**

Научный руководитель:
доктор химических наук, проф.
Карцова Людмила Алексеевна

**Санкт-Петербург
2017**

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА I. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	12
I.1. Имидазолиевые ионные жидкости: свойства	12
I.2. Применение имидазолиевых ионных жидкостей	18
I.2.1. Применение ионных жидкостей в жидкостной хроматографии	18
<i>I.2.1.1. Ионные жидкости в составе подвижной фазы</i>	<i>18</i>
<i>I.2.1.2. Ионные жидкости как компоненты стационарных фаз</i>	<i>24</i>
I.2.2. Применение ионных жидкостей в капиллярном электрофорезе ...	33
<i>I.2.2.1. Ионные жидкости в качестве динамических модификаторов стенок кварцевого капилляра</i>	<i>33</i>
<i>I.2.2.2. Ковалентная модификация стенок кварцевого капилляра на основе ионных жидкостей</i>	<i>36</i>
<i>I.2.2.3. Применение ионных жидкостей в качестве псевдостационарных фаз</i>	<i>37</i>
<i>I.2.2.4. Ионные жидкости в процессах on-line концентрирования</i>	<i>40</i>
I.2.3. Применение ионных жидкостей в ВЭЖХ и КЭ для разделения энантиомеров	41
I.3. Ионные жидкости в качестве экстрагентов	43
I.3.1. Применение ионных жидкостей в жидкостно-жидкостной экстракции	43
I.3.2. Твердофазная экстракция с участием ионных жидкостей	46
I.3.3. Процессы микроэкстракции с участием ионных жидкостей	49
ГЛАВА II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	52
II.1. Оборудование и реактивы	52
II.2. Синтез хиральных аминокислотных ионных жидкостей	56

П.2.1. Синтез аминокислотных ионных жидкостей ([C₂MIm][L-Pro], [C₄MIm][L-Pro], [C₈MIm][L-Pro], [C₁₂MIm][L-Pro])	56
П.2.2. Синтез аминокислотной ионной жидкости [C₄MIm][L-Glu]	56
П.3. Синтез ковалентных покрытий на основе ионных жидкостей	57
П.3.1. Травление кварцевого капилляра	57
П.3.2. Силанизация кварцевого капилляра	57
П.3.3. Функционализация силанизированного капилляра	57
П.3.4. Оценка стабильности ковалентных покрытий	58
П.2. Методы исследования	60
П.2.1. Высокоэффективная хроматография стероидных гормонов и аминокислот	60
<i>П.2.1.1. Условия хроматографического разделения аминокислот</i>	60
<i>П.2.1.2. Условия разделения стероидных гормонов методом ВЭЖХ</i>	61
П.2.2. Электрофоретические эксперименты	63
<i>П.2.2.1. Подготовка капилляра к работе</i>	63
<i>П.2.2.2. Приготовление буферных растворов</i>	63
<i>П.2.2.3. Условия электрофоретического разделения</i>	64
П.3. Жидкостная экстракция	66
П.3.1. Экстракция аминокислот в ионные жидкости	66
<i>П.3.1.1. Жидкостно-жидкостная экстракция аминокислот в ионные жидкости C₆MImNTf₂, C₆MImBF₄, C₈MImBF₄</i>	66
<i>П.3.1.2. Жидкостно-жидкостная экстракция аминокислот в ионную жидкость C₆MImNTf₂ с добавкой 18-краун-6</i>	67
<i>П.3.1.3. Жидкостно-жидкостная экстракция аминокислот в ионную жидкость C₆MImNTf₂ при различном значении pH водной фазы</i>	68
П.3.2. Экстракция кортикостероидов в ионные жидкости	68

II.3.2.1. Жидкостно-жидкостная экстракция кортикостероидов в ионные жидкости $C_6MImNTf_2$, C_6MImBF_4 , C_8MImBF_4	68
II.3.2.2. Жидкостно-жидкостная экстракция кортикостероидов в ионную жидкость C_8MImBF_4 с добавкой циклодекстринов в водную фазу.....	69
II.3.2.3. Обратная экстракция кортикостероидов из ионной жидкости C_8MImBF_4 в водную фазу с добавкой циклодекстринов	70
II.3.3. Дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция стероидных гормонов с участием ионной жидкости C_8MImBF_4	71
II.4. Пробоподготовка образцов мочи	73
II.4.1. Пробоподготовка образцов мочи для электрофоретического определения аминокислот	73
II.4.2. Пробоподготовка образцов мочи для электрофоретического определения катехоламинов.....	73
II.4.3. Пробоподготовка образцов мочи для электрофоретического определения стероидных гормонов	74
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	75
ГЛАВА III. ИОННЫЕ ЖИДКОСТИ В КАЧЕСТВЕ ДИНАМИЧЕСКИХ МОДИФИКАТОРОВ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИХ СИСТЕМ.....	76
Глава IV. КОВАЛЕНТНЫЕ ПОКРЫТИЯ СТЕНОК КВАРЦЕВОГО КАПИЛЛЯРА НА ОСНОВЕ ИОННЫХ ЖИДКОСТЕЙ	85
ГЛАВА V. ИОННЫЕ ЖИДКОСТИ – ХИРАЛЬНЫЕ СЕЛЕКТОРЫ	92
V.1. Разделение энантиомеров аминокислот в условиях лигандообменного капиллярного электрофореза с хиральной ионной жидкостью $[C_4MIm][L-Pro]$ в фоновом электролите	94
V.2. Электрофоретическое разделение энантиомеров β -адреноблокаторов при совместном введении в фоновый электролит хиральной ионной жидкости $[C_4MIm][L-Pro]$ и (2-гидроксипропил- β -циклодекстрина)	104
ГЛАВА VI. ИОННЫЕ ЖИДКОСТИ В КАЧЕСТВЕ ЭКСТРАГЕНТОВ ...	108

VI. 1. Извлечение аминокислот из водной фазы в ионные жидкости $C_6MImNTf_2$, C_6MImBF_4, C_8MImBF_4	109
VI. 2. Извлечение стероидных гормонов из водной фазы в ионные жидкости $C_6MImNTf_2$, C_6MImBF_4, C_8MImBF_4	112
VI.2.1. Жидкостно-жидкостная экстракция стероидных гормонов	112
VI.2.1. Дисперсионная микроэкстракция стероидных гормонов	115
ГЛАВА VII. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ	117
VII.1. Определение аминокислот в образцах мочи	118
VII.2. Определение катехоламинов в образцах мочи	119
VII.3. Определение стероидных гормонов в образцах мочи	120
VII.4. Сопоставление аналитических характеристик изученных ионных жидкостей при экстракции и электрофоретическом определении аналитов различной полярности	122
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	126
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	128
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	131
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. ЯМР-спектры $[C_2MIm][L-Pro]$ на ядрах 1H и ^{13}C	154
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. ЯМР-спектры $[C_4MIm][L-Pro]$ на ядрах 1H и ^{13}C	156
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. ЯМР-спектры $[C_8MIm][L-Pro]$ на ядрах 1H и ^{13}C	158
ПРИЛОЖЕНИЕ 4. ЯМР-спектры $[C_{12}MIm][L-Pro]$ на ядрах 1H и ^{13}C	160
ПРИЛОЖЕНИЕ 5. ЯМР-спектры $[C_4MIm][L-Glu]$ на ядрах 1H и ^{13}C	162

ВВЕДЕНИЕ

Капиллярный электрофорез (КЭ) – активно востребуемый метод разделения заряженных и незаряженных аналитов, достоинствами которого являются высокая эффективность, экспрессность, малый расход реагентов. С другой стороны, имеется ряд ограничений: сорбция на стенках отрицательно заряженного кварцевого капилляра основных аналитов (белков, пептидов, катехоламинов, и т.д.), приводящая к снижению эффективности и низкая УФ концентрационная чувствительность.

Для того, чтобы предотвратить адсорбцию аналитов на поверхности кварцевого капилляра и влиять на скорость электроосмотического потока (ЭОП), применяют различные способы модифицирования стенок капилляра. Наиболее простым - является введение в фоновый электролит добавок, способных блокировать силанольные группы поверхности капилляра. В последние годы для этой цели стали применять и ионные жидкости.

Под термином *«ионные жидкости»* (ИЖ) подразумевают широкий класс органических соединений, представляющих собой соли с температурой плавления ниже 100 °С. Возможность варьировать природу составляющих ионов позволяет регулировать гидрофобность, растворимость и другие свойства ИЖ, что открывает перспективы к их использованию в качестве добавок в составе элюента в жидкостной хроматографии и фонового электролита в капиллярном электрофорезе.

Несмотря на активное применение имидазольных ионных жидкостей в методах разделения и концентрирования, их роль при определении биологически активных соединений методом КЭ изучена мало.

Перспективным направлением является применение ИЖ в составе электрофоретических систем при определении диагностических маркеров заболеваний нервной, сердечно-сосудистой и эндокринной систем: биогенных

аминов, аминокислот и стероидных гормонов. Так, введение ИЖ в фоновый электролит может способствовать увеличению эффективности при определении основных аналитов в условиях капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ), а при концентрациях выше критической концентрации мицеллообразования (ККМ), формировать псевдостационарную фазу, обеспечивая разделение стероидных гормонов в режиме МЭКХ.

Ковалентные покрытия на основе ИЖ в сочетании с методами *on-line* концентрирования могут обеспечить снижение пределов обнаружения аминокислот и катехоламинов до значений, достаточных для определения их в биологических жидкостях.

Использование ИЖ в процессах экстракции позволит упростить процедуру пробоподготовки и сократить время анализа при определении соединений различной полярности.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 14-03-00735-а и №. 16-03-00791-а.

Цель работы

Выявить возможности влияния ахиральных и хиральных имидазолиевых ионных жидкостей в составе фонового электролита на процессы разделения, концентрирования и экстракции аминокислот, катехоламинов, стероидных гормонов.

В связи с поставленной целью необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучение влияния имидазолиевых ионных жидкостей $C_{12}MImCl$ и $C_{16}MImCl$ в качестве динамических модификаторов электрофоретических систем на миграционные характеристики основных (аминокислот и катехоламинов) и нейтральных (стероидных гормонов) аналитов в условиях

капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) и мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ).

2. Разработка способа ковалентной модификации стенок кварцевого капилляра на основе ионных жидкостей и поиск вариантов *on-line* концентрирования на модифицированных капиллярах для снижения пределов обнаружения аминокислот и катехоламинов; получение сравнительных оценочных характеристик по пределам обнаружения, эффективности, селективности разделения.

3. Выявление возможностей аминокислотных ионных жидкостей ряда $[C_nMIm][L-Pro]$ ($n = 2, 4, 8, 12$) с хиральным анионом разделять энантиомеры аминокислот и β -блокаторов.

4. Изучение экстракционных процессов аналитов различной природы из водной фазы в гидрофобные имидазольные ионные жидкости.

5. Разработка общей схемы электрофоретического анализа образцов мочи с применением ионных жидкостей в процессах разделения и экстракции аминокислот, катехоламинов, стероидных гормонов.

Научная новизна

Установлено, что введение в фоновый электролит имидазольных ионных жидкостей ($C_{12}MImCl$, $C_{16}MImCl$) способствует динамической модификации стенок кварцевого капилляра, созданию анодного электроосмотического потока (ЭОП), росту эффективности (в КЗЭ) и селективности разделения (в МЭКХ) аминокислот и катехоламинов в 2-3 раза.

Показано, что применение аминокислотной ионной жидкости $[C_4MIm][L-Pro]$ с хиральным анионом в качестве лиганда с солями меди (II) в составе фонового электролита (pH 12.2) обеспечивает разделение энантиомеров триптофана и тирозина с высокими значениями факторов разрешения (до 5.2).

Установлено, что совместное введение в фоновый электролит двух хиральных селекторов – хиральной ионной жидкости $[C_4MIm][L-Pro]$ и (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрина - приводит к увеличению факторов разрешения энантиомеров карведилола и пропранолола в 1.5 раза по сравнению с результатами, полученными в отсутствии ИЖ.

Предложен способ ковалентной модификации кварцевого капилляра с образованием покрытия на основе N-бутилзамещенной имидазолиевой ионной жидкости, обеспечившей увеличение эффективности и селективности разделения аминокислот и катехоламинов.

Предложен вариант дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции для извлечения стероидных гормонов из водной фазы в ионную жидкость C_8MImBF_4 , позволяющий сконцентрировать аналиты в 23-30 раз в процессе пробоподготовки.

Практическая значимость работы

Предложен способ синтеза стабильного при pH 2.0 ковалентного покрытия стенок кварцевого капилляра на основе N-бутилимидазолиевой ионной жидкости, обеспечивший высокую воспроизводимость параметров миграции аналитов, и в сочетании с *on-line* концентрированием (сви́пинг с большим объемом вводимой пробы, сви́пинг с электростэкингом) позволивший снизить пределы обнаружения катехоламинов до 1-2 нг/мл и аминокислот до 5-40 нг/мл.

Разработана схема пробоподготовки образцов мочи для электрофоретического определения аминокислот с участием ионных жидкостей в качестве экстрагента ($C_6MImNTf_2$) и динамического модификатора ($C_{16MImCl}$) стенок кварцевого капилляра. Степени извлечения составили 92-100%, пределы обнаружения – 30-55 нг/мл.

Предложенный вариант дисперсионной микроэкстракции стероидных гормонов в ионную жидкость C_8MImBF_4 в сочетании с их электрофоретическим разделением методом МЭКХ обеспечил определение этих аналитов в образцах мочи с пределами обнаружения 8-12 нг/мл и степенями извлечения 69-93%.

Степень достоверности и апробация результатов настоящей работы подтверждается хорошей воспроизводимостью аналитических результатов.

Положения, выносимые на защиту

1. Электрофоретическое определение аминокислот и катехоламинов с введением в фоновый электролит имидазолиевых ионных жидкостей $C_{12}MImCl$ и $C_{16}MImCl$, обеспечивших модификацию стенок кварцевого капилляра и рост эффективности.

2. Применение ионной жидкости $C_{16}MImCl$ в качестве псевдостационарной фазы с реализацией режима мицеллярной электрокинетической хроматографии для селективного разделения стероидных гормонов.

3. Создание ковалентного покрытия стенок кварцевого капилляра на основе N-бутилзамещенной имидазолиевой ионной жидкости, обеспечивающего в сочетании с внутрикапиллярным концентрированием снижение пределов обнаружения для аминокислот 5-40 нг/мл и катехоламинов - 1-2 нг/мл.

4. Применение аминокислотных ионных жидкостей с хиральным анионом в качестве индивидуальных и смешанных селекторов с циклодекстринами для электрофоретического разделения энантиомеров аминокислот и β -блокаторов методом лигандообменного капиллярного электрофореза.

5. Разработанные схемы пробоподготовки образцов мочи с извлечением в ионную жидкость аминокислот (жидкостно-жидкостная экстракция) и стероидных гормонов (дисперсионная микроэкстракция).

Публикации и апробация работы Материалы диссертации опубликованы в 4 статьях и 13 тезисах докладов. Результаты исследований докладывались на Втором съезде аналитиков России (2013 г, Москва, Россия), VI-ой Международной конференции молодых ученых «Органическая химия сегодня» Inter CYS-2014 (2014 г, Санкт-Петербург, Россия), на IV Всероссийском симпозиуме с международным участием «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (2014 г, Краснодар, Россия), на XIV конференции «Физико-химические основы ионообменных и хроматографических процессов (ИОНИТЫ–2014)» (2014 г, Воронеж, Россия), European Meeting on Environmental Chemistry (2014 г, Брно, Чехия), IX International conference of young scientist on chemistry “Mendeleev – 2015”, (2015 г, Санкт-Петербург, Россия), на Всероссийской конференции «Теория и практика хроматографии» с международным участием, посвященная памяти М.С.Вигдергауза, (2015 г, Самара, Россия), I Всероссийской конференции с международным участием «Химический анализ и медицина» (2015 г, Москва, Россия), на VI международном молодежном конгрессе «Санкт-Петербургские научные чтения – 2015» (2015 г, Санкт-Петербург, Россия), 40th International symposium on Capillary Chromatography and 13th GC*GC Symposium (2016 г, Riva del Garda, Italy), на XX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (2016 г, Екатеринбург, Россия), Пятом Всероссийском симпозиуме с международным участием «Кинетика и динамика обменных процессов» (2016 г, Сочи, Россия).

Работа выполнена с использованием оборудования Ресурсного образовательного центра, Научный парк, СПбГУ.

ГЛАВА I. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

I.1. Имидазолиевые ионные жидкости: свойства

В последнее десятилетие прослеживается тенденция к активному применению в методах разделения (хроматографии и капиллярном электрофорезе) ионных жидкостей (ИЖ) [1–12]. Термином «ионные жидкости» объединяют широкий класс солей, имеющих температуру плавления ниже 100⁰С. ИЖ с температурой плавления, близкой к комнатной или ниже, иногда называют «room temperature – ionic liquids» (RTILs) [2–6]. Как правило, они состоят из объемного органического катиона и органического или неорганического аниона [1] (Рис. 1).

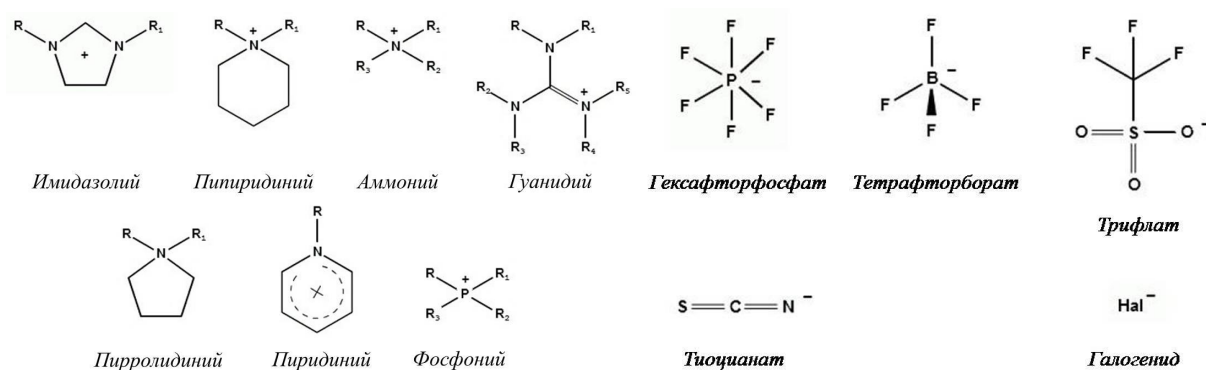


Рис. 1. Наиболее часто встречаемые катионы и анионы в составе ионных жидкостей [1].

Впервые ионная жидкость – этаноламмоний нитрат - с температурой плавления 52–55 ⁰С была получена в 1888 г., а первая RTILs (нитрат этиламмония [EtNH₃][NO₃]) с температурой плавления ниже комнатной (+12.5 ⁰С) синтезирована в 1914 г [13]. Позднее синтезирован новый класс RTILs – хлороалюминаты диалкилимидазолия [14], однако они не получили широкого распространения из-за своей гигроскопичности и высокой реакционной способности. Широкая востребованность ИЖ в области аналитической химии началась лишь с 1992 г., когда были синтезированы

первые устойчивые на воздухе и в воде ИЖ с имидазольевым катионом со слабо комплексообразующими анионами, например, BF_4^- [15].

Ионные жидкости, в основном, представляют собой бесцветные вещества с относительно высокой вязкостью. Они являются хорошими растворителями для широкого ряда неорганических, органических и полимерных материалов. Физико-химические свойства ИЖ обусловлены природой катиона и аниона. Так, термическая стабильность и смешиваемость с другими растворителями главным образом зависят от природы аниона, а вязкость, поверхностное натяжение и плотность – от длины алкильного радикала в катионе [3, 4].

В настоящее время наиболее изученным классом являются имидазольевые ИЖ.

Вот их главные характеристики.

Температура плавления

Ионные жидкости, как правило, содержат объемный несимметричный органический катион, что обуславливает относительно низкие температуры плавления по сравнению с классическими солями. Температура плавления имидазольевых ИЖ понижается с увеличением несимметричности замещенного катиона [5], например, для C_4MImPF_6 она составляет -61°C , а для C_6MImPF_6 -78°C [6]. ИЖ с разветвленными алкильными радикалами обладают более высокой температурой плавления, чем их линейные аналоги. Например, $i\text{-C}_3\text{MImPF}_6$ плавится при температуре 102°C , а C_3MImPF_6 – при 40°C [5].

Выявить влияние природы аниона на температуру плавления не всегда возможно из-за присутствия следовых количеств воды в ионной жидкости, которая взаимодействует как с катионом, так и с анионом. При сравнении температур плавления ИЖ, состоящих из структурно схожих анионов, например, трифлат (TfO^- , трифторметансульфонат) и Tf_2N^- (бис-(трифторметилсульфонил)имид, ИЖ с Tf_2N^- -ионом характеризуются меньшими

температурами плавления: в этом случае электроны в молекуле аниона делокализованы, и образование межмолекулярных водородных связей невозможно. Так, ионная жидкость $C_2MImCF_3CO_2$ имеет температуру плавления на $31\text{ }^{\circ}C$ меньше, чем $C_2MImCH_3CO_2$ [7].

Таким образом, можно выделить следующие закономерности изменения температуры плавления ИЖ от их состава:

- температура плавления уменьшается с увеличением несимметричности катиона и аниона;
- при увеличении объема аниона, температура плавления снижается;
- чем больше степень взаимодействия между ионами ИЖ, тем ниже температура плавления.

Термическая стабильность

Термическую устойчивость соединений измеряют в процессе гравиметрического или дифференциального термического анализа. В общем случае, ИЖ термически стабильны и начинают разлагаться только при температурах выше $350\text{ }^{\circ}C$. Стабильность их мало меняется с увеличением объема катиона, в то время как увеличение гидрофильности аниона в ряду $NTf_2^- > PF_6^- > BF_4^- > NaI^-$ приводит к резкому снижению устойчивости.

Так, ионные жидкости с катионом C_8MIm^+ и анионами PF_6^- и Cl^- стабильны при температурах 376 и $243\text{ }^{\circ}C$, соответственно [7]. Увеличение объема катиона не приводит к значительному изменению стабильности ИЖ. Ионные жидкости C_2MImBF_4 , C_4MImBF_4 и $C_{18}MImBF_4$ разлагаются при температурах 412 , 360 и $360\text{ }^{\circ}C$, соответственно [8].

Вязкость

Ионные жидкости обладают более высокой вязкостью по сравнению с водой. При увеличении длины алкильного радикала в составе катиона ИЖ наблюдается рост вязкости [9]. Такой же эффект отмечен и при понижении температуры [10]. Повышение вязкости различных ИЖ объясняют

преобладанием Ван-дер-Ваальсовых сил по сравнению с водородными связями [7]. На вязкость влияют также строение и молекулярная масса аниона ИЖ: чем более симметричен ион и больше его молекулярная масса, тем выше вязкость [10].

Плотность

Ионные жидкости обладают довольно высокой плотностью, что обусловлено их упорядоченным строением. Как правило, рост молекулярной массы аниона ИЖ приводит к увеличению плотности [11].

Например, ионная жидкость, содержащая в качестве аниона бис(метилсульфонил)амид (Ms_2N^-), обладает плотностью меньшей, чем в случае бис(трифторметилсульфонил)имида (Tf_2N^-), хотя их объемы одинаковы, а молекулярная масса фтора больше [16].

Критическая концентрация мицеллообразования

Критическая концентрация мицеллообразования (ККМ) – концентрация поверхностно-активного вещества (ПАВ) в растворе, превышение которой приводит к образованию мицелл и, соответственно, изменению физико-химических свойств раствора.

До сих пор не изучены полностью закономерности формирования мицелл и эмульсий с участием ионных жидкостей, а также влияние природы составляющих их ионов на структуру сформированных мицелл.

Существуют различные подходы к оценке значения ККМ, среди которых наибольшее распространение получили способы определения этих величин по проводимости и поверхностному натяжению [17-20] раствора. Согласно [17], значение ККМ поверхностно-активных веществ определяется как концентрация, при которой происходит максимальное изменение свойств (поверхностное натяжение, проводимость) раствора, что может быть описано уравнениями (1) и (2):

$$\left(\frac{d^3\varphi}{dC_T^3}\right)_{C_T=CMC} = 0, \quad (1)$$

$$\varphi = a[C_s] + b[C_m], \quad (2)$$

где φ – значение параметра, используемого для определения ККМ, а C_m – общая концентрация ПАВ (мМ), где C_s и C_m – концентрации мономерного ПАВ и мицеллы (мМ) соответственно.

Значение ККМ определяли по экстремуму второй производной, полученной при обработке зависимости измеренного параметра (поверхностного натяжения или проводимости) раствора от концентрации ПАВ. Таким способом рассчитать ККМ для C_4MImCl и C_6MImCl оказалось невозможно. В [17] построены графические зависимости ККМ от числа атомов углерода в радикале для ИЖ состава C_nMImCl (Рис. 2).

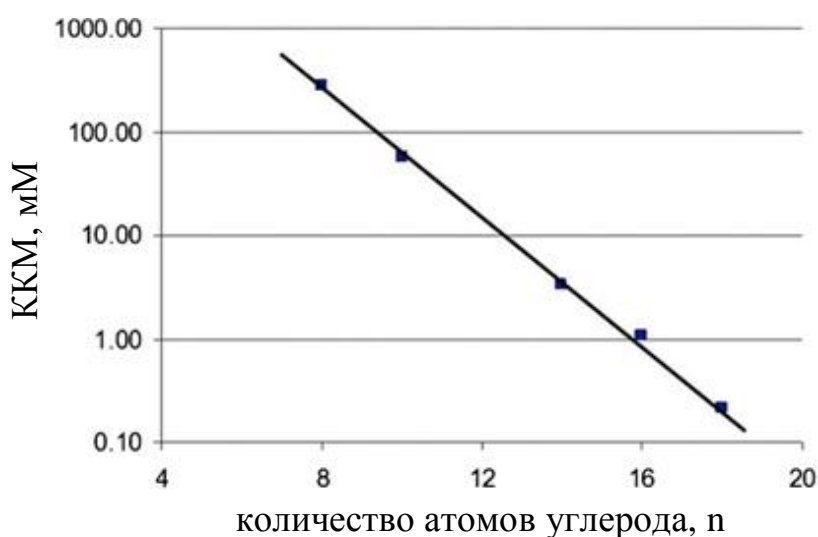


Рис. 2. Зависимость значения ККМ от длины алкильного радикала при 25 °С для ионных жидкостей состава C_nMImCl [17].

Авторами [17] обнаружена непосредственная зависимость значений ККМ от гидрофобности ионных жидкостей, которая определялась как константа распределения вещества между водой и октан-1-олом.

Предложены различные способы определения гидрофобности методом ВЭЖХ [21-23].

Корреляция между гидрофобностью и временем удерживания вещества в ОФ ВЭЖХ не является строго линейной [24]. Чем больше время удерживания, тем выше гидрофобность анализата. При этом значения ККМ имеют логарифмическую зависимость от времени удерживания ПАВ (Рис. 3.) [17].

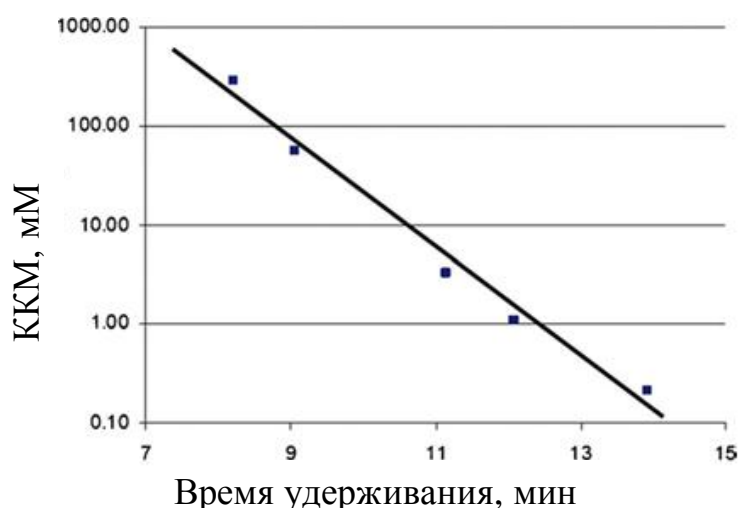


Рис. 3. Зависимость ККМ ПАВ от времени удерживания в ВЭЖХ [17].

Значения ККМ для ионных жидкостей ряда C_nMImCl , полученные различными методами, представлены в табл. 1.

Таблица 1. Критические концентрации мицеллообразования ионных жидкостей состава C_nMImCl , рассчитанные разными методами (25 °C) [17].

Длина алкильного радикала в катионе, n	Критическая концентрация мицеллообразования (мМ)			Времена удерживания t_R , мин
	По проводимости раствора	По поверхностному натяжению раствора	Среднее значение ККМ	
4	-	-	-	5.82
6	-	-	-	7.17
8	220	234	227	8.21
10	59.9	53.8	56.8	9.07
14	3.38	3.15	3.26	11.54
16	1.26	1.14	1.21	12.08
18	0.40	0.45	0.43	13.92

I.2. Применение имидазолиевых ионных жидкостей

I.2.1. Применение ионных жидкостей в жидкостной хроматографии

I.2.1.1. Ионные жидкости в составе подвижной фазы

Наиболее распространенный вариант ВЭЖХ — обращенно-фазовый, где в качестве стационарных фаз используют силикагели с привитыми алкильными радикалами. На поверхности таких неподвижных фаз находятся остаточные силанольные группы, диссоциирующие в рабочем диапазоне при $2.5 < \text{pH} < 7.5$ и обладающие кислотными свойствами. Стационарная фаза приобретает отрицательный заряд и становится слабым катионообменником, что приводит к увеличению времен удерживания положительно заряженных протонированных основных соединений. В результате хроматографические пики аналитов характеризуются низкой эффективностью и высокими коэффициентами асимметрии.

Существует несколько путей решения этой проблемы: использование стационарных фаз, основанных не на силикагеле; проведение разделения при pH, близком к 3; введение в состав подвижных фаз (ПФ) катионных или анионных добавок, которые могут взаимодействовать со стационарной фазой и блокировать силанольные группы. Главными механизмами подавления действия остаточных групп ОН в последнем случае являются непосредственная нейтрализация анионных силанольных сайтов (для катионных добавок) и гидрофобные взаимодействия между модификаторами и стационарной фазой с образованием бислоев, препятствующих проникновению основных аналитов к силанольным группам (Рис. 4). Классическими добавками такого рода являются амины и их производные [25–27].

В последнее время для этой цели в качестве модификаторов стали использовать ионные жидкости, вводимые в элюент, при анализе смесей аминокислот [28], основных лекарственных препаратов [29, 30], алкалоидов

[31, 32], аминов [33-35], фталевых кислот [36], антибиотиков [37, 38], антидепрессантов [39], противовирусных препаратов [40], β -адреноблокаторов [41-45], гетероциклических ароматических аминов [46-48], белков [49].

Механизм взаимодействия ИЖ со стационарной фазой более сложный, чем в случае аминов и додецилсульфата натрия (ДДСН). Ионные жидкости ведут себя как двойные модификаторы с катионным и анионным характером: на поверхности неподвижной фазы могут адсорбироваться как катионы ИЖ, так и анионы, образуя двойной положительно или отрицательно заряженный слой в зависимости от относительной силы адсорбции ионов [42, 50].

Изучено влияние имидазольных ИЖ с различными алкильными радикалами на хроматографическое разделение смеси β -блокаторов на сорбенте С18 [42, 43]. В качестве референтных взяты катионная (триэтиламин) и анионная (ДДСН) модифицирующие добавки, и исследован возможный механизм взаимодействий между аналитами и неподвижной фазой (Рис. 4).

Обнаружено, что введение в состав подвижной фазы ИЖ со слабо адсорбирующимися анионами (Cl^- , Br^-) приводит к снижению параметров удерживания основных соединений. Замена ионов Cl^- на BF_4^- или PF_6^- , т.е. на анионы, обладающие большим сродством к неподвижной фазе, привела к увеличению факторов удерживания β -блокаторов.

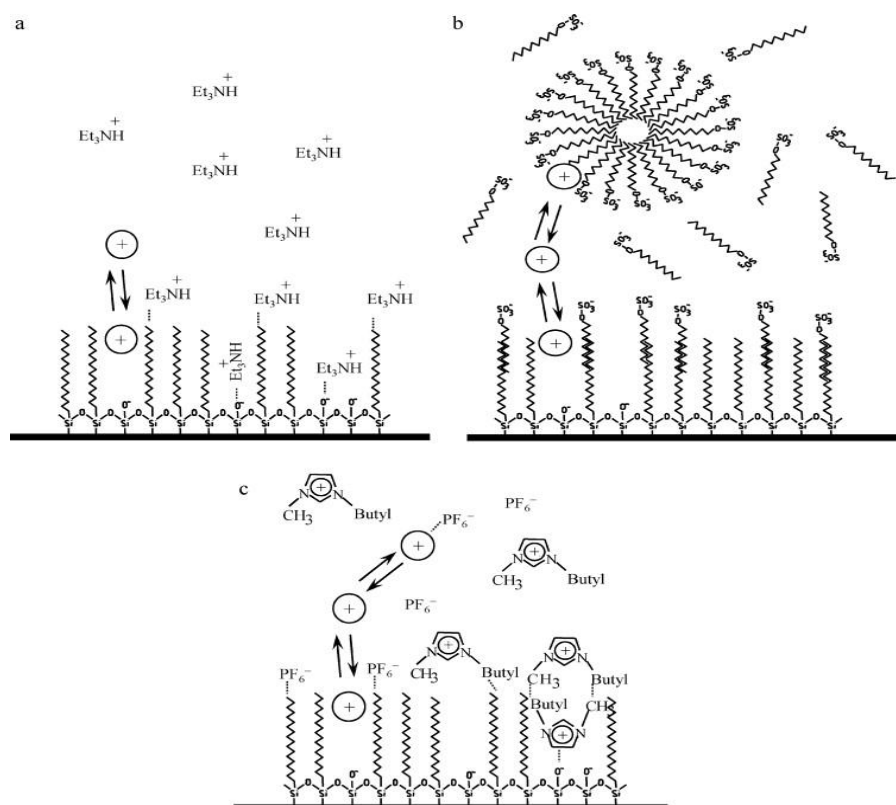


Рис. 4. Различные типы взаимодействий добавок в элюенте со стационарной фазой C₁₈: (а) – триэтиламин, (б) – ДДСН, (с) – ионная жидкость [42].

При добавлении незначительного количества ИЖ в состав ПФ, времена удерживания для всех аналитов снижаются, а эффективность увеличивается. Это обусловлено электростатическими взаимодействиями между имидазольной группой ИЖ и остаточными силанольными группами стационарной фазы (Рис. 4). В результате количество свободных групп –ОН сорбента резко снижается, что и приводит к уменьшению асимметрии пиков и, как следствие, к росту эффективности.

В [51] изучалась зависимость эффективности и селективности разделения эфедринов от концентрации ионной жидкости C₄MImBF₄ в составе элюента. В отсутствии ИЖ пики характеризуются низкой эффективностью, и при этом псевдоэфедрин и метилэфедрин не разделяются (Рис. 5).

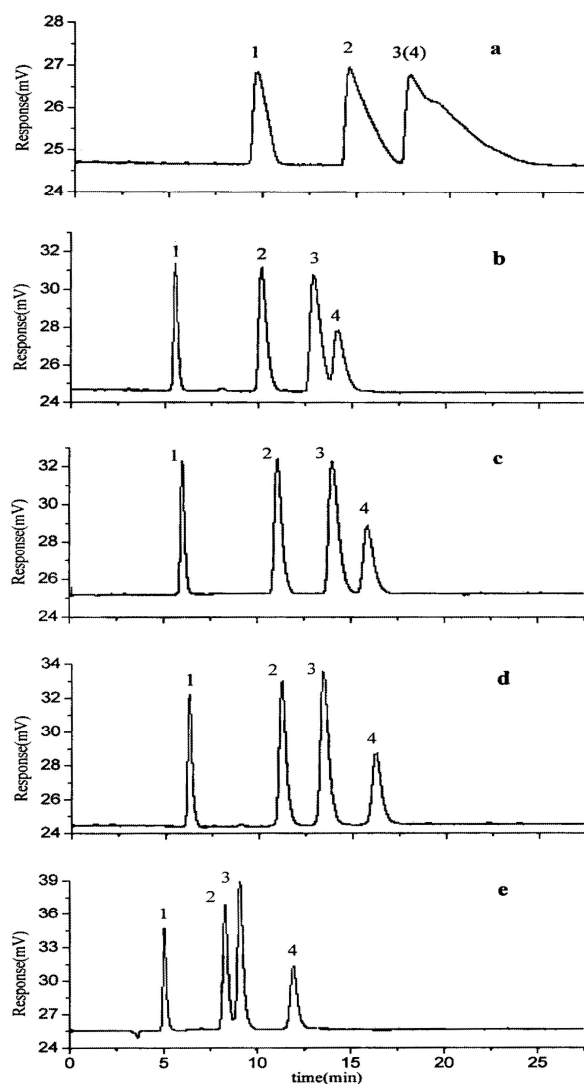


Рис. 5. Хроматограммы модельной смеси эфедринов. Условия: колонка C_{18} ($5\ \mu\text{m}$, $100 \times 4.6\ \text{mm I.D.}$), скорость потока – 1 мл/мин; 252 нм; элюент – раствор соляной кислоты ($\text{pH} = 3.0$) с добавкой $C_4\text{MImBF}_4$: а) 0 мМ, б) 2.6 мМ, в) 5.2 мМ, г) 20.8 мМ, е) 62.4 мМ.

1 – норэфедрин, 2 – эфедрин, 3 – псевдоэфедрин, 4 – метилэфедрин [51].

Катионы ИЖ могут связываться с радикалами C_{18} за счет гидрофобных взаимодействий, в результате образуется бислой, поверхность которого представляет собой положительно заряженные имидазольные группы.

За счет электростатического отталкивания положительно заряженные аналиты практически не взаимодействуют со стационарной фазой, и времена удерживания аналитов, соответственно, снижаются.

Природа аниона также существенным образом влияет на разделение катехоламинов: как и в случае β -блокаторов, параметры удерживания увеличивались при замене анионов Cl^- на анионы BF_4^- (Рис 6).

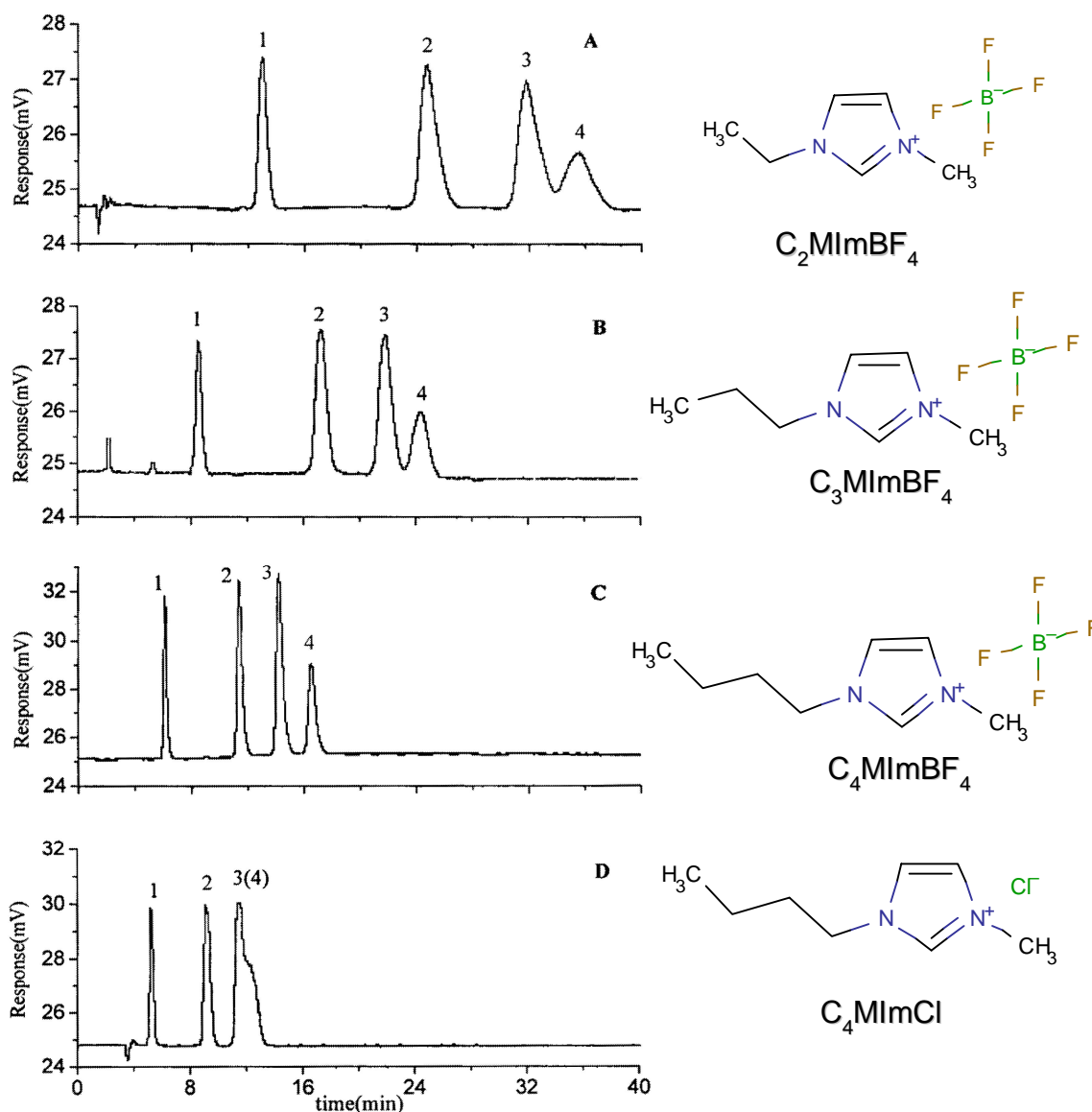


Рис. 6. Хроматограммы модельной смеси эфедринов. Условия: колонка C_{18} ($5 \mu\text{m}$, $100 \times 4.6 \text{ mm I.D.}$), скорость потока – 1 мл/мин; 252 нм, элюент – раствор соляной кислоты вода ($\text{pH} = 3.0$) с добавкой А) 10.4 мМ C_2MImBF_4 , В) 10.4 мМ C_3MImBF_4 , С) 10.4 мМ C_4MImBF_4 , D) 10.4 мМ C_4MImCl . 1 – норэфедрин, 2 – эфедрин, 3 – псевдоэфедрин, 4 – метилэфедрин [51].

Ионные жидкости в составе ПФ не только блокируют силанольные группы на поверхности сорбента [35], но могут выступать по отношению к

разделяемым анализам и в качестве ион-парного агента [52]. В [53] установлено, что многослойная абсорбция ИЖ влияет на удерживание ионогенных анализом. Если же анализы обладают кислотными свойствами или являются цвиттер-ионными соединениями, их факторы удерживания практически не меняются [28]. На селективность разделения влияют и водородные связи между имидазольевым катионом ИЖ и его противоионом или анализом [54]. При этом определяющими являются длина алкильного радикала и степень замещения в имидазольевом катионе [55]. В зависимости от структуры ИЖ механизм подавления остаточных силанольных групп может существенно меняться [56, 57]. В [44] показано, что введение ИЖ в состав подвижной фазы приводит к изменению доминирующего механизма разделения анализом, о чем свидетельствует иной порядок элюирования β -блокаторов в присутствии ИЖ (Рис. 7).

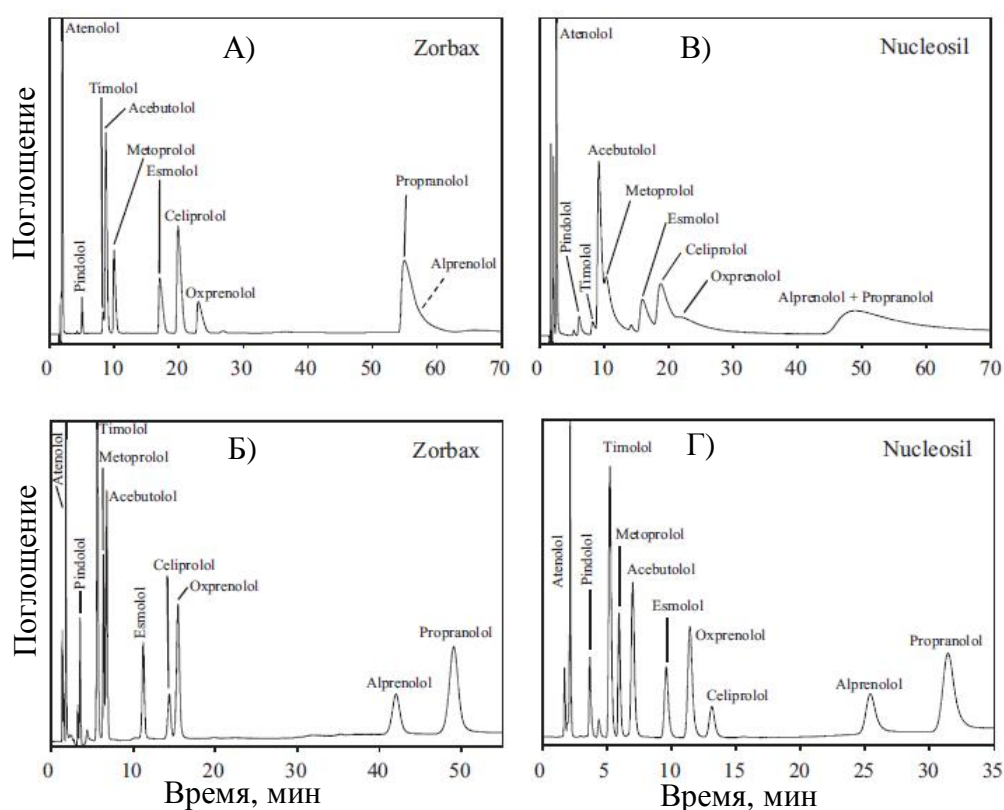


Рис. 7. Хроматограммы β -адреноблокаторов на колонках Zorbax SB-C18 (А и Б) и Nucleosil (В и Г) (150 мм×4.6 мм, 3,5 мкм): (А) 15.8 % CH_3CN ; (Б) 10.0 % CH_3CN 23.2 мМ C_6MImBF_4 ; (В) 18.1 % CH_3CN ; (Г) 10.0 % CH_3CN 24.4 мМ C_6MImBF_4 [44].

В отсутствие ионной жидкости в элюенте разделение β -блокаторов характеризуется низкой эффективностью. При добавлении C_6MImBF_4 , катионы ИЖ адсорбируются на поверхности фазы C18, блокируя свободные силанольные ОН-группы и предотвращая их взаимодействие с положительно заряженными молекулами лекарственных препаратов. Разделение аналитов, в этом случае происходит преимущественно за счет гидрофобных взаимодействий с алкильными радикалами стационарной фазы, что в свою очередь, приводит к уменьшению времен удерживания и асимметрии пиков.

ИЖ в составе подвижных фаз применяются не только для подавления действия остаточных групп -ОН, но и в качестве хромофорных добавок, обеспечивающих обнаружение не поглощающих в УФ-области аналитов в условиях косвенного детектирования [58-60]. Использование высокочувствительных детекторов, таких как флуориметрический или электрохимический, способствует снижению пределов обнаружения аналитов и устранению одного из ограничений применения ИЖ в ВЭЖХ, связанное с их поглощением в УФ-области [38, 47].

Так, добавление тетрафторбората 1-бутил-3-метилимидазолия в ПФ позволило не только увеличить селективность разделения гетероциклических ароматических аминов, но и нивелировать «эффект памяти» при проведении твердофазной микроэкстракции [47]. Эти же авторы показали, что введение ИЖ в элюент при использовании электрохимического детектирования значительно снижает уровень шумов по сравнению с ацетатом аммония [46]. Использованию подвижных фаз, содержащих ионные жидкости, посвящены обстоятельные обзоры [50, 61].

1.2.1.2. Ионные жидкости как компоненты стационарных фаз

Наряду с добавками в элюент, ИЖ применяют в ВЭЖХ и в качестве стационарных фаз, например, иммобилизуют на поверхность носителя посредством ковалентного связывания или за счет полимеризации одного из

составляющего ее ионов [62]. В принципе, существует пять различных видов стационарных фаз на основе ИЖ (Рис. 8) [63].

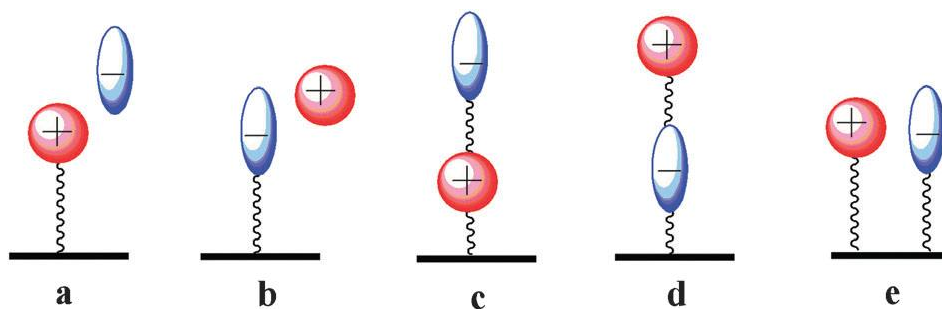


Рис. 8. Схемы различных вариантов иммобилизации ИЖ на поверхности носителя: (a) и (b) ионные жидкости иммобилизованы через катион или анион; (c) и (d) иммобилизация цвиттер-ионных ионных жидкостей через катион или анион; (e) иммобилизация и через катион, и через анион [63].

Стационарные фазы, в которых один из ионов ИЖ иммобилизован к поверхности носителя, а второй - свободный (Рис. 8a и 8b), легче всего получить. При этом противоион может быть замещен на другой, что позволяет варьировать характеристики неподвижной фазы. Подобным образом в [64] была приготовлена стационарная фаза, в которой в качестве противоиона использовался 3-метил-1-октадецилимидазолиевый катион, и успешно применена для разделения модельной смеси органических оснований, нуклеозидов и полиароматических углеводов.

В цвиттер-ионных неподвижных фазах (НФ) катион и анион ИЖ ковалентно связаны (Рис. 8c и 8d). Это предотвращает легкую замену одного из ионов, и делает НФ стабильными. Такие фазы на основе ИЖ были получены Quia и др. и успешно испытаны в варианте гидрофильной хроматографии (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC)) при разделении водорастворимых витаминов и азотистых оснований [65]. В другом типе стационарных фаз катион и анион ИЖ соиммобилизованы на поверхности носителя. Так, в [63] впервые проведена соиммобилизация ИЖ, способной к полимеризации (Рис. 9).



Рис. 9. Схема синтеза соиммобилизованной стационарной фазы на основе ионной жидкости. Sil-MPS – меркаптопропил-модифицированный силикагель, AIBN – азодиизобутиронитрил – инициатор полимеризации [63].

Синтезированные НФ содержат различные функциональные группы, что позволяет применять их как в режиме ОФ ВЭЖХ, так и в HILIC для разделения азотистых оснований (Рис. 10).

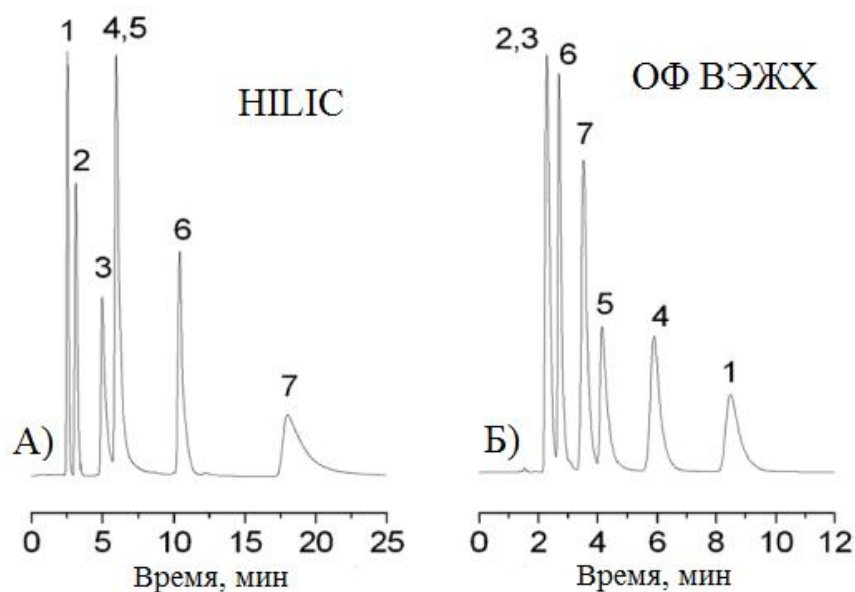


Рис. 10. Хроматограммы модельных смесей оснований и нуклеотидов в различных режимах. Условия: (а) HILIC, 10 % 20 мМ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, 90 % CH_3CN ; (б) ОФ ВЭЖХ, 20 мМ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$. Аналиты: 1- теofilлин, 2- урацил, 3 – уридин, 4 – аденозин, 5 – аденин, 6 – цитозин, 7 – гуанозин [63].

Стационарные фазы на основе ИЖ подразделяют на мономерные и полимерные (Рис. 11) [62]. Существует два подхода к созданию мономерных неподвижных фаз: гомогенный и гетерогенный процессы [62].

В первом случае – силикагель сначала модифицируют сшивающим агентом, затем к функционализированной поверхности стационарной фазы присоединяют замещенный имидазол с образованием ИЖ *in situ*. В гомогенном процессе на первой стадии синтезируют силилирующий реагент на основе ИЖ, который затем иммобилизируют на поверхность силикагеля (Рис. 12) [62].

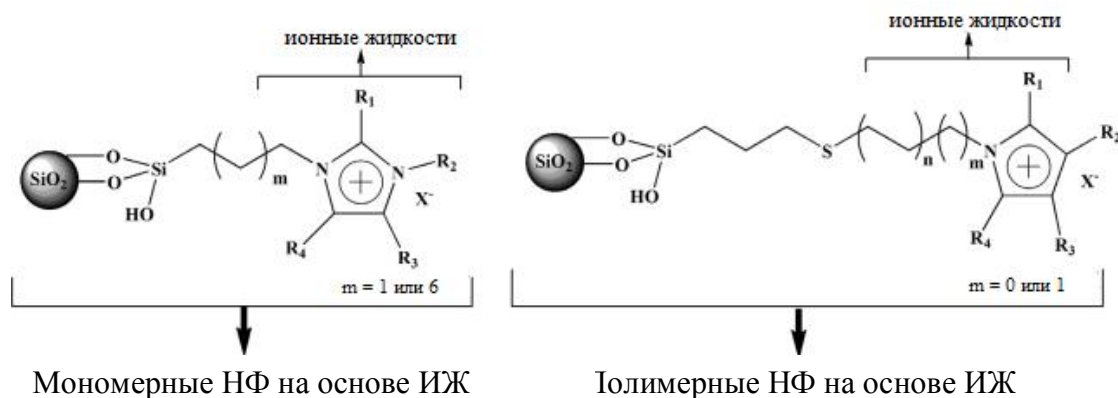


Рис. 11. Структуры стационарных фаз на основе ионных жидкостей [62].

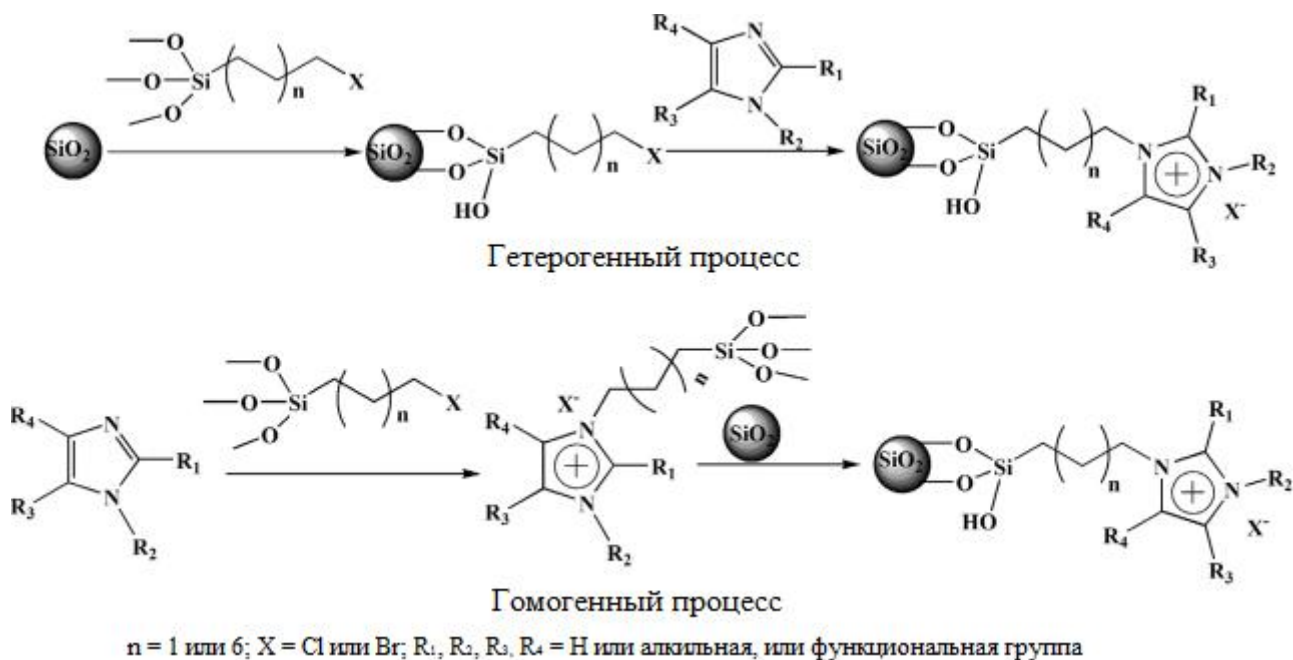


Рис. 12. Общая схема синтеза мономерных стационарных фаз на основе ионных жидкостей [62].

При создании полимерных фаз в качестве сшивающего агента, в первую очередь, применяют 3-меркаптопропилтриметоксисилан, а в реакцию полимеризации вступают ИЖ с аллильными или винильными группами (Рис. 13) [62].

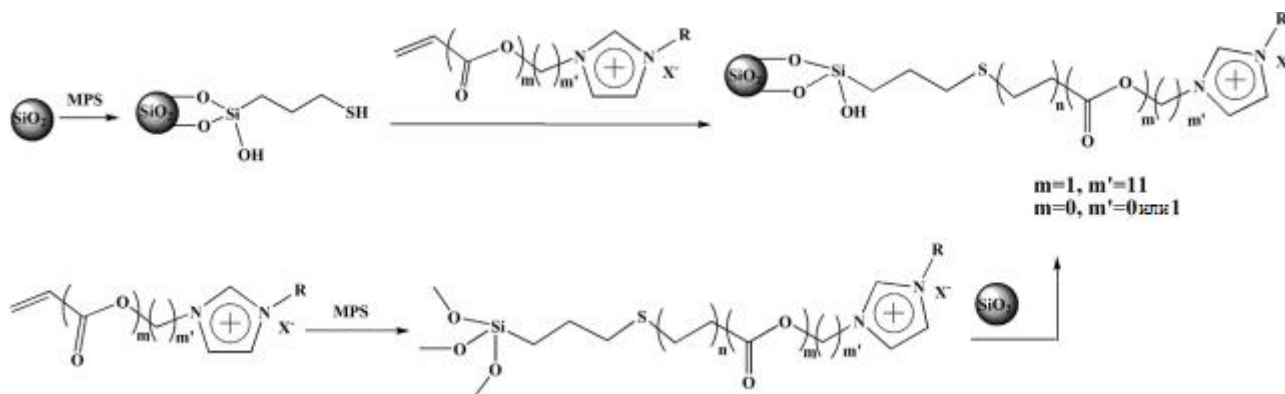


Рис. 13. Общая схема синтеза полимерных стационарных фаз на основе ионных жидкостей [62].

Синтезированные стационарные фазы хорошо зарекомендовали себя в различных вариантах ВЭЖХ при разделении как органических, так и неорганических соединений (табл. 2).

ИЖ применяются и при приготовлении монолитных колонок [77-81]. В [77] успешно синтезированы имидазолиевые монолитные колонки. Возможность реализации различных механизмов разделения на полученных колонках была исследована при определении заряженных и нейтральных аналитов. Разделение неорганических анионов достигнуто за счет анионного обмена и гидрофильных взаимодействий; нуклеотидов, ароматических кислот и фенолов - за счет анионного обмена, диполь-дипольных и π - π взаимодействий, а также ПАУ и алкилбензолов – с участием π - π и гидрофобных взаимодействий [77].

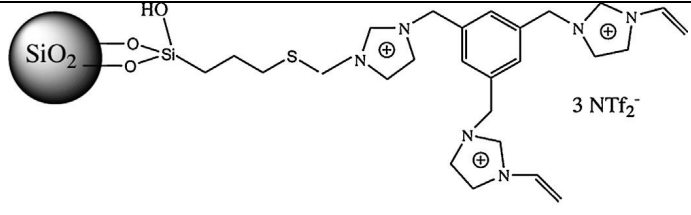
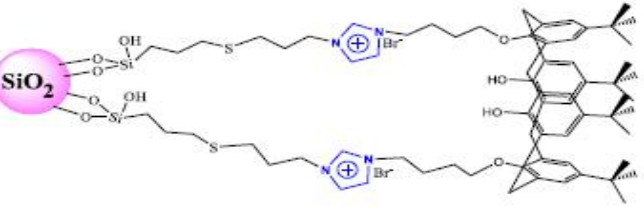
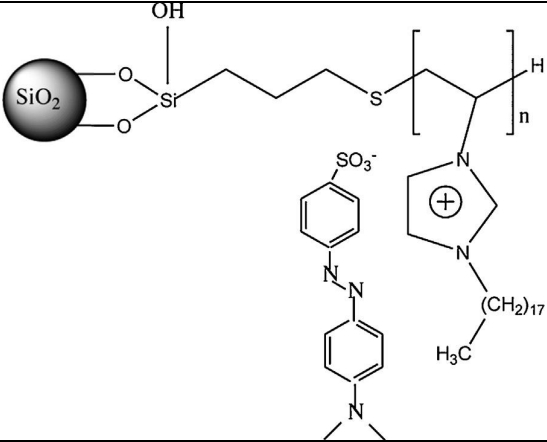
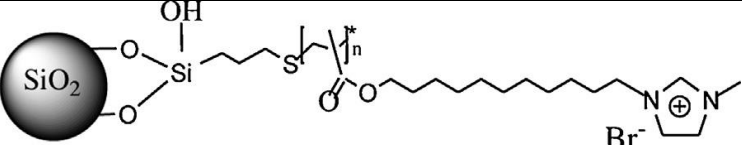
В [78] получены гибридные монолитные колонки на основе ИЖ, которые были испытаны в режиме капиллярной электрохроматографии (КЭХ)

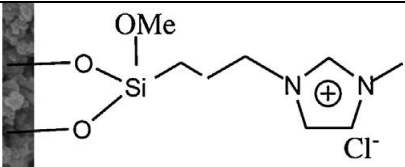
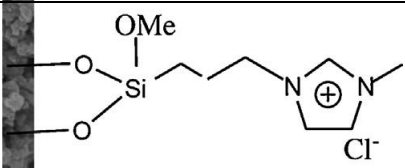
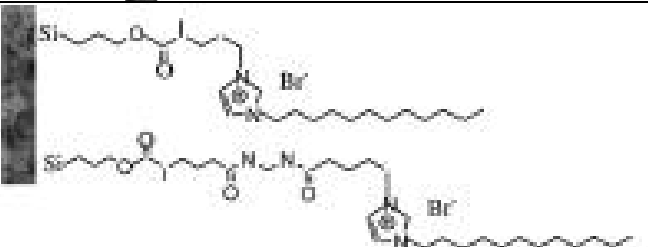
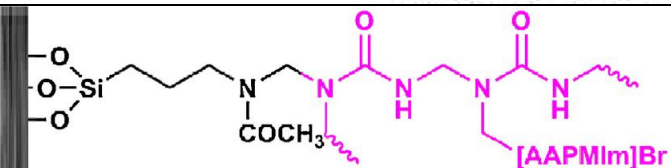
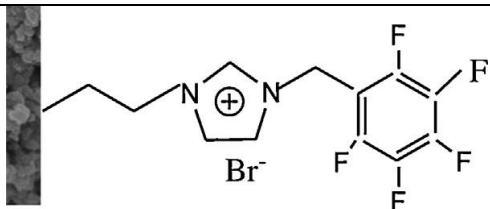
при разделении анилинов, алкилбензолов и белков. А в [80] предложен способ создания молонитных колонок путем *in-situ* поликонденсацией мочевины, формальдегида и ациламинофункционализированной ИЖ. В условиях КЭХ на таких колонках разделены с высокой эффективностью и селективностью фенолы, бензойные кислоты, пептиды путем реализации гидрофильных и анионообменных взаимодействий, а также образования водородных связей.

Общие подходы к синтезу стационарных фаз с привитыми ИЖ и области их применения в ВЭЖХ обсуждаются в обзорах [62,82-83].

Таблица 2. Применение стационарных фаз на основе ионных жидкостей.

Структура НФ	Механизм удерживания	Аналиты	Литература
	НІІІС, анионный обмен	Нуклеозиды, нуклеотиды	[66]
	ОФ, анионный обмен	Алкилбензоны, алкилнафталины, производные ПАУ	[67]
	НІІІС, анионный обмен	Водорастворимые витамины, аминокислоты, ароматические кислоты	[68]
	ОФ, анионный обмен	ПАУ	[69]
	ОФ, НІІІС, анионный обмен	ПАУ, анилины, неорганические и органические анионы, нуклеозиды, азотистые основания, замещенные бензойные кислоты	[70, 71]

	ОФ, HILIC	ПАУ, нуклеозиды, флавоноиды	[72]
	ОФ, HILIC, анионный обмен	Алкилбензолы, фенолы, нуклеозиды, неорганические анионы	[73]
	ОФ, π - π - взаимодействия	ПАУ, алкилбензолы, стероидные гормоны	[74, 75]
	Ионный обмен, ОФ, HILIC	Неорганические анионы, ПАУ, нуклеозиды	[76]

	ОФ, анионный обмен,	Неорганические анионы, нуклеотиды, фенолы	[77]
	КЭХ	Ароматические углеводороды, неорганические анионы	[78]
	ОФ, анионный обмен	Алкилбензолы, анилины, белки	[79]
	Гидрофильные, анионный обмен	Фенолы, бензойные кислоты, энкефалины	[80]
	Ионный обмен, ОФ	Ароматические углеводороды, нуклеозиды, галогенированные соединения	[81]

I.2.2. Применение ионных жидкостей в капиллярном электрофорезе

Главными проблемами при разделении различных соединений методом капиллярного электрофореза являются сорбция основных аналитов на стенках кварцевого капилляра, что приводит к снижению эффективности и невоспроизводимости параметров миграции, а также низкая чувствительность при УФ-детектировании из-за малого объема вводимой пробы и короткого оптического пути. В зонном варианте КЭ не достигается разделение нейтральных аналитов, мигрирующих вместе с электроосмотическим потоком. В последние годы для решения этих проблем наряду с другими модификаторами стали применять ионные жидкости.

I.2.2.1. Ионные жидкости в качестве динамических модификаторов стенок кварцевого капилляра

Для того, чтобы предотвратить адсорбцию аналитов на поверхности кварцевого капилляра и влиять на скорость ЭОП, применяют различные способы модифицирования стенок кварцевого капилляра, в результате которых блокируются силанольные группы на его поверхности.

В [84] для разделения 7 катехинов в фоновый электролит вводили ионную жидкость Et_4NBF_4 . Показано, что добавка ИЖ приводит к модификации стенок кварцевого капилляра, что позволило с высокой эффективностью определить катехины в косточках винограда. Позднее та же научная группа [85] исследовала влияние различных ИЖ, в том числе и имидазольных, на электрофоретические параметры миграции антиоксидантов полифенольного типа. Введенные в фоновый электролит ионные жидкости модифицировали стенки кварцевого капилляра, что сопровождалось обращением ЭОП (Рис. 14). Помимо модификации ИЖ взаимодействовали с аналитами с участием π - π -связей: образующиеся положительно заряженные комплексы «аналит-ионная жидкость» мигрировали по направлению к катоду.

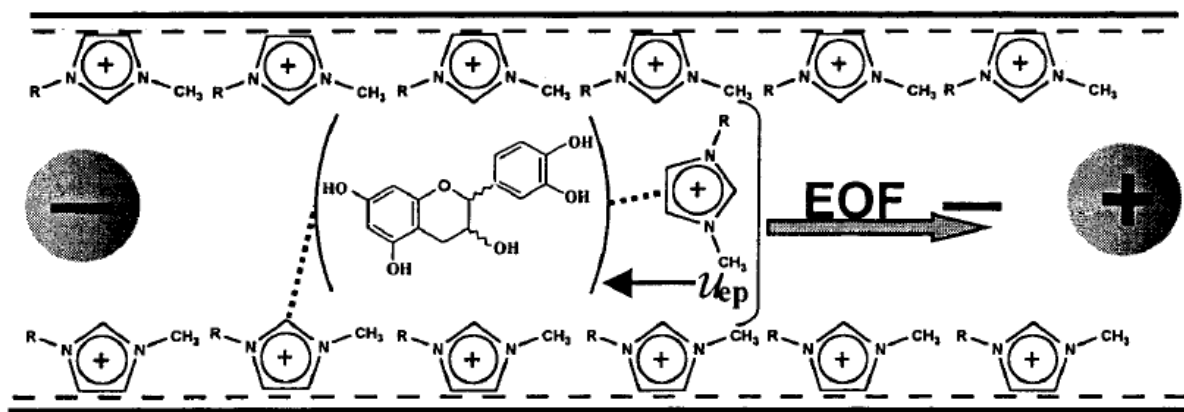


Рис. 14. Схема механизма разделения полифенольных антиоксидантов с введением ионных жидкостей с имидазолиевым катионом [85].

Имидазолиевые ИЖ успешно применены в качестве динамических модификаторов при разделении β -агонистов [86] и флавоноидов [87]. В [88] представлены результаты использования ионной жидкости C_4MImBF_4 в качестве добавки в фоновый электролит для одновременного определения восьми изофлавонов в природных объектах. На основании проведенных исследований авторы заключили, что ИЖ в составе фонового электролита выполняют две функции: модификация стенок кварцевого капилляра, приводящая к обращению ЭОП, и взаимодействие с аналитами, изменяющее их параметры миграции.

Имидазолиевые ионные жидкости в КЭ применяют и для формирования хромофорного фона, обеспечивающего обнаружение не поглощающих в УФ-области спектра аналитов в условиях косвенного детектирования. Так, в [89] введение ионной жидкости $C_4MImC_3F_7CO_2$ в фоновый электролит позволило определить неорганические ионы в минеральной воде в варианте неводного КЭ (НВКЭ) (Рис. 15).

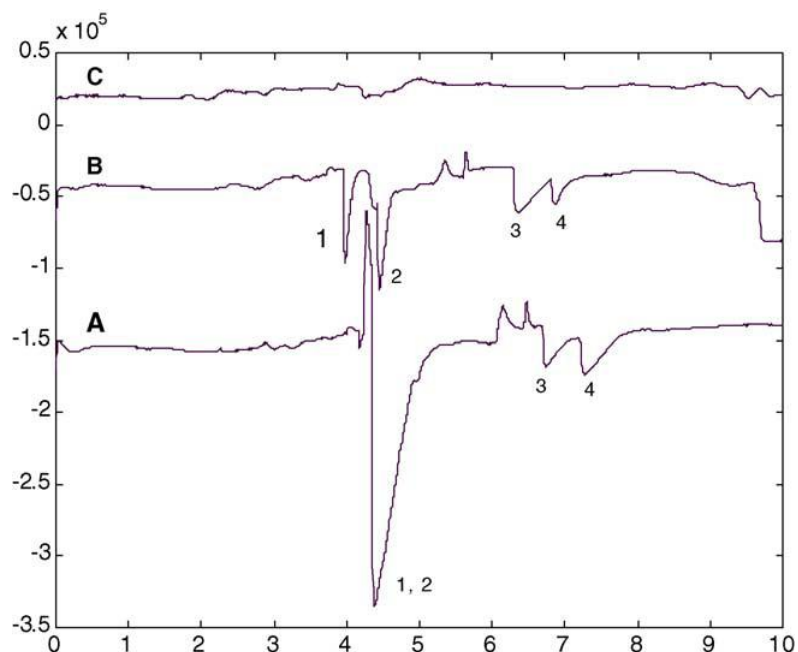


Рис. 15. Электрофореграммы минеральных вод «Värška» и «Vichy». Условия: фоновый электролит: 20 мМ $C_4MImC_3F_7CO_2$ в метаноле. $\lambda = 210$ нм, напряжение - 20 кВ. А) минеральная вода «Värška», В) минеральная вода «Vichy», С) деионизированная вода. Аналиты: (1) K^+ , (2) Na^+ , (3) Mg^{2+} , (4) Ca^{2+} [89].

Метод НВКЭ обладает рядом преимуществ по сравнению с водным вариантом при разделении заряженных и незаряженных соединений: низкая вязкость фонового электролита, основанного на органических растворителях (метанол, ацетонитрил), высокая скорость ЭОП, высокая собственная электрофоретическая подвижность аналитов из-за отсутствия сольватационной оболочки [90] и возможность масс-спектрометрического детектирования [91]. Вахер и др. [92] впервые использовали ИЖ в качестве фонового электролита при разделении не растворимых в воде красителей в условиях ацетонитрильного неводного КЭ. Добавление ионной жидкости оказалось принципиальным, поскольку в ее отсутствие аналиты мигрировали без разделения вместе с ЭОП. Зависимость скорости ЭОП от концентрации и природы ИЖ изучалась в [93, 94]. Имидазолиевые ионные жидкости нашли также применение при разделении карбоновых кислот, полифенольных

соединений [95] и флаваноидов [96] в условиях НВКЭ. Проведение электрофоретического разделения в органических растворителях обуславливает усиление взаимодействий (диполь-дипольных, электростатических, водородных, π - π) между ИЖ и аналитами, что, в свою очередь, благоприятствует увеличению селективности разделения.

1.2.2.2. Ковалентная модификация стенок кварцевого капилляра на основе ионных жидкостей

Способ динамической модификации стенок кварцевого капилляра обладает рядом ограничений: недостаточная воспроизводимость получаемых результатов за счет сильной сорбции ИЖ на поверхности капилляра, снижение чувствительности анализа за счет хромофорного фона, создаваемого имидазолиевыми катионами. Требуется постоянное возобновление покрытия.

Альтернатива динамическим покрытиям - ковалентные, достоинства которых являются стабильность и высокая воспроизводимость (генерация стабильного обращенного ЭОП). Основным результатом, как и в случае динамической модификации, является предотвращение сорбции основных аналитов. Возможность дополнительных взаимодействий аналитов с ИЖ обеспечивает увеличение селективности разделения.

В [97] впервые применили кварцевые капилляры, покрытые ионными жидкостями, для разделения фрагментов ДНК. Такие капилляры обеспечили обращенный ЭОП и сокращение времени анализа, по сравнению с полиакриламидными покрытиями. Ковалентные покрытия на основе N-метилзамещенной имидазолиевой ионной жидкости использовали при определении препарата силденафила и его метаболита в сыворотке крови

человека методом КЭ с масс-спектрометрическим детектированием [98], ионов металлов [99] и алкилфосфониевых кислот [100].

1.2.2.3. Применение ионных жидкостей в качестве псевдостационарных фаз

Незаряженные аналиты в зонном режиме капиллярного электрофореза (КЗЭ) не определяются, поскольку они мигрируют вместе с ЭОП. Для решения этой проблемы обычно в фоновый электролит вводят ПАВ в концентрации, превышающей ККМ. В результате формируется псевдостационарная фаза, и аналиты распределяются между мицеллой и фоновым электролитом. Так как мицелла заряжена, комплекс *аналит-мицелла* мигрирует в направлении противоположно заряженного электрода (режим мицеллярной электрокинетической хроматографии, МЭКХ).

Метод МЭКХ обеспечивает разделение как ионных, так и нейтральных аналитов. Классическим анионным детергентом, обычно применяемым в МЭКХ, является додецилсульфат натрия (ДДСН), однако он имеет относительно высокое значение критической концентрации мицеллообразования (8.2 мМ), что ограничивает его применение при низких температурах [101], а также является причиной узкого окна миграции. Высоко гидрофобные аналиты взаимодействуют с ядром мицелл ДДСН и мигрируют с ними одновременно [102]. Размер окна миграции может быть увеличен путем добавления органического растворителя в фоновый электролит [101-104], использования смеси ПАВ различной природы или путем модификации поверхности капилляра для ослабления ЭОП. Среди других добавок, вводимых для этой цели в фоновый электролит, хорошо зарекомендовали себя циклодекстрины (ЦД) и краун-эфиры [105-108], ион-парные реагенты [109], глюкоза [110], полимеры [111, 112], полиэлектролитные комплексы [113].

В качестве новых мицеллообразующих веществ нашли применение и ионные жидкости, содержащие большой углеводородный радикал [114–118].

Так, ионная жидкость тетрафторборат 1-додецил-3-метилимидазолия ($C_{12}MImBF_4$) применялась в качестве псевдостационарной фазы при разделении лекарственных препаратов и гербицидов [111]. В [119] исследовалась возможность использования ИЖ $C_{14}MImBr$ в качестве псевдостационарной ионообменной фазы при определении гидрофильных нуклеозидов в режиме МЭКХ.

Предложен следующий механизм электрофоретического разделения с участием ионных жидкостей (Рис. 16): аналиты при $pH = 9.38$ заряжены отрицательно, а борат-ионы придают дополнительный отрицательный заряд нуклеозидам путем образования комплекса с *цис*-диольными группами рибозы. За счет электростатических взаимодействий с ИЖ происходит разделение определяемых соединений (Рис. 17).

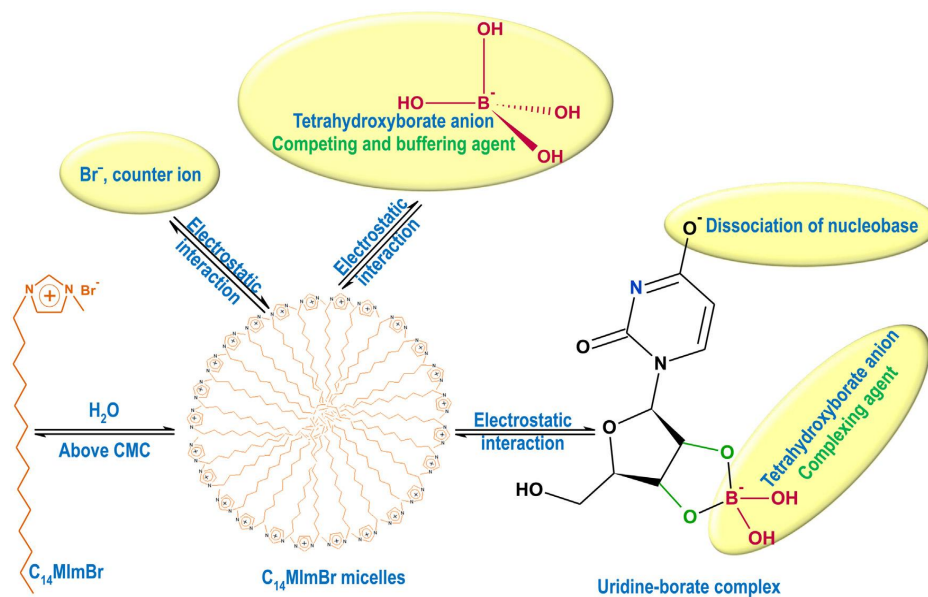


Рис. 16. Схема возможных взаимодействий в системе «ионная жидкость - боратный буфер – нуклеозид» [119].

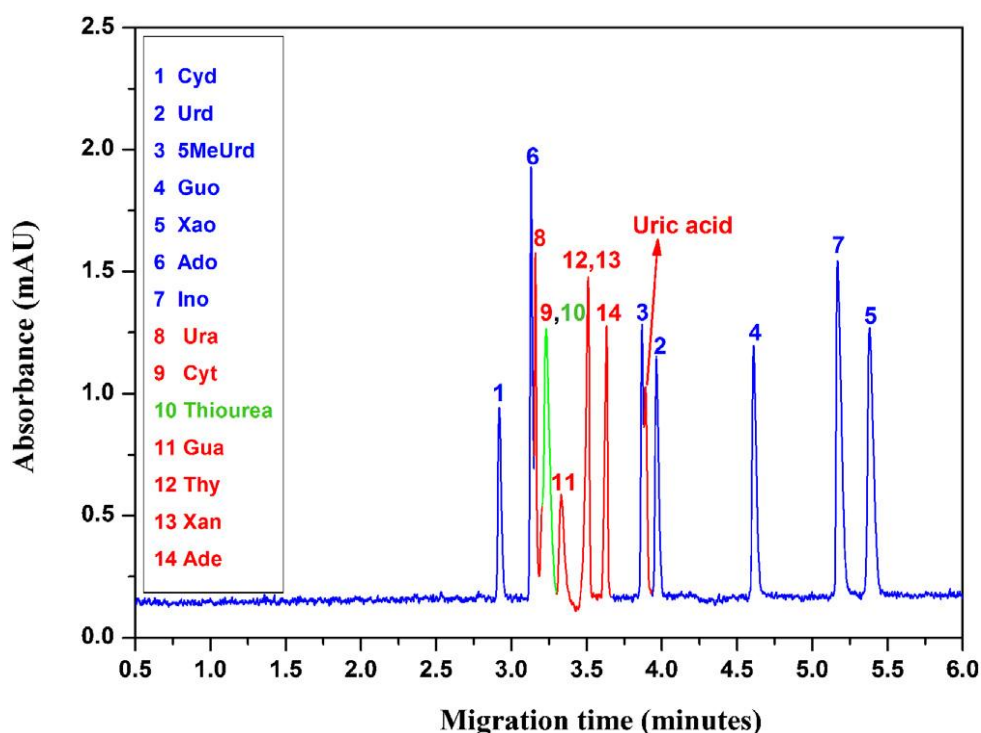


Рис. 17. Электрофореграмма модельной смеси нуклеозидов.

Условия: 20 mM $C_{14}MImBr$, 5 mM $Na_2B_4O_7$, pH 9.38. $U = -20$ кВ. 1 – цитидин, 2 – уридин, 3 – 5-метилуридин, 4 – гуанозин, 5 – ксантозин, 6 – аденозин, 7 – инозин, 8 – урацил, 9 – цитозин, 10 – тиомочевина, 11 – гуанин, 12 – тимин, 13 – ксантин, 14 – аденин [119].

Имидазолиевые ИЖ нашли применение и в электрофоретическом разделении различных аналитов с использованием смешанных мицелл. Так, в [120] одновременно вводили в фоновый электролит ИЖ на основе катиона 1-бутил-3-метилимидазолия и ДДСН, в концентрациях, превышающих ККМ, что позволило увеличить селективность разделения компонентов смеси бензодиазепинов. В [121] показано, что применение смешанных мицелл на основе ДДСН с добавкой $C_{16}MImCl$ приводит к резкому увеличению эффективности для стероидных гормонов, а селективность разделения удалось повысить добавлением метанола в состав фонового электролита (Рис. 18).

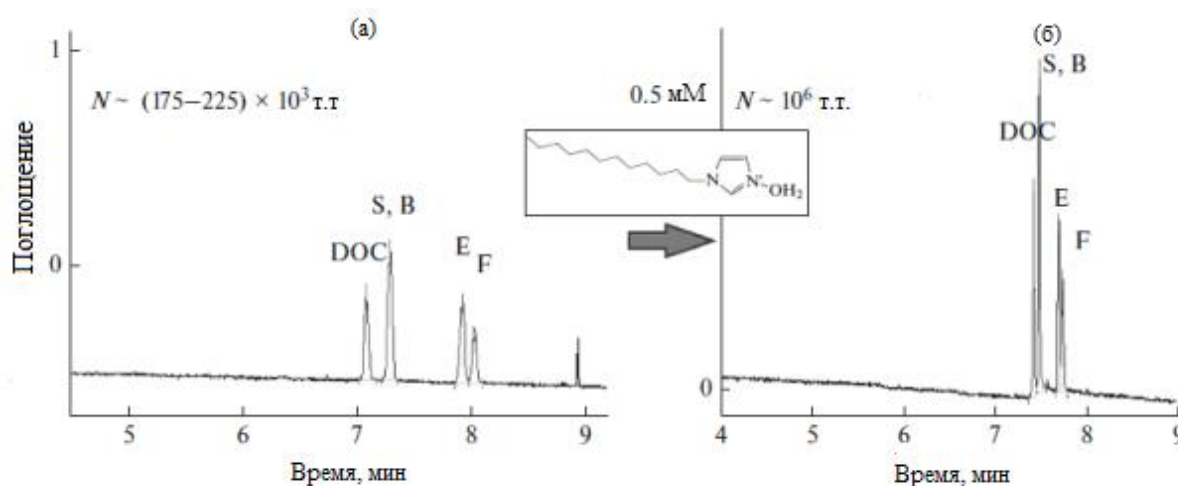


Рис. 18. Электрофореграмма смеси стероидных гормонов в условиях МЭКХ. Условия: (а) 25 мМ ацетатный буферный раствор ($\text{pH} = 4.0$), 25 мМ ДДСН (б) 25 мМ ацетатный буферный раствор ($\text{pH} = 4.0$), 25 мМ ДДСН, 0.5 мМ $\text{C}_{16}\text{MImCl}$; $U = 20$ кВ, $\lambda = 242$ нм [121]. Аналиты: DOC – 11-дезоксикортикостерон, F – кортизол, E – кортизон, S-11-дезоксикортизол, В-кортикостерон [121].

1.2.2.4. Ионные жидкости в процессах *on-line* концентрирования

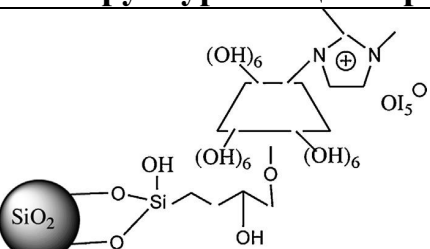
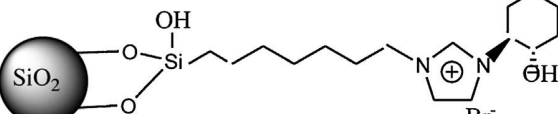
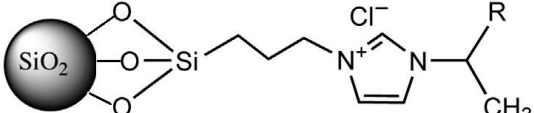
Решение другой проблемы метода КЭ - низкой чувствительности - применение различных вариантов внутрикапиллярного (*on-line*) концентрирования, где ионные жидкости также уже востребованы [121-125].

Так, в [122] ИЖ $\text{C}_{12}\text{MImBF}_4$ использовали в качестве псевдостационарной фазы для концентрирования профенов в условиях стэкинга с разрушением мицелл в режиме МЭКХ. Достигнутые пределы обнаружения были в 6 раз ниже по сравнению с классическим катионным детергентом - цетилтриметиламмоний бромидом (ЦТАБ), и составили 60-120 нг/мл. Методом МЭКХ в сочетании со свипингом с участием ИЖ определяли стероидные гормоны [121], бенздиазепины [123], катехины [124], метотрексат и фолиевую кислоту [125].

I.2.3. Применение ионных жидкостей в ВЭЖХ и КЭ для разделения энантиомеров

В имидазолиевых ионных жидкостях может быть хиральным либо радикал в составе катиона, или анион. ИЖ с хиральным катионом применяют в качестве стационарных фаз в ВЭЖХ для разделения энантиомеров биологически активных соединений. Так, в [126] на стационарных фазах с привитыми хиральными имидазолиевыми и 1,2,3-триазилиевыми ионными жидкостями, функционализированные производными β -ЦД, разделяли энантиомеры лекарственных препаратов и ароматических спиртов с высокой энантиоселективностью. Синтезированы и изучены хиральные неподвижные фазы на основе 2-(1H-имидазол-1-ил) циклогексана [128] (табл. 3).

Таблица 3. Хиральные стационарные фазы на основе ионных жидкостей.

Структура стационарных фаз	Аналиты	Лит.
	<p>Рацемические смеси 12 ароматических спиртов и 2 лекарственных препаратов</p>	[126]
	<p>Энантиомеры гексахелиценов</p>	[127]
	<p>Лекарственные препараты, производные миндальной кислоты, производные 1-фенилэтиламина</p>	[128]

Для аминокислотных ИЖ с хиральным анионом характерны незначительное поглощение в УФ-области, стабильность, высокая биосовместимость и легкость синтеза по сравнению с другими хиральными ИЖ [129-131]. Ионные жидкости ряда $[C_nMIm][L-Pro]$ ($n=2, 4, 6, 8$) нашли

применение в лигандообменной ВЭЖХ и лигандообменном капиллярном электрофорезе (ЛОКЭ) в качестве хиральных лигандов, координированных с ионами Cu(II), при разделении энантимеров фенилаланина, гистидина, триптофана и тирозина [129]. Показано, что при увеличении длины алкильного радикала в ИЖ увеличивается селективность разделения аминокислот как в условиях ЛОКЭ, так и в ВЭЖХ. Лучшие результаты достигнуты при разделении энантиомеров методом ЛОКЭ при pH 4.0, а в ВЭЖХ факторы энантиоселективности, как оказалось, мало зависят от pH подвижной фазы. В [132] применяли в качестве хирального лиганда ионную жидкость [C₄MIm][L-Orn], координированную с ионами Zn (II) для разделения энантиомеров дансильных производных аминокислот (pH = 8.4).

Обнаружен синергетический эффект совместного введения в состав фонового электролита (2-гидроксипропил)-β-циклодекстрина (ГП-β-ЦД) и [C₂MIm][L-Lac] (L-лактата) при разделении энантиомеров 10 лекарственных препаратов (pH = 2.75) [133]. Авторы объясняют наблюдаемый эффект следующим: энантиомеры аналитов могут быть включены в полость β-ЦД и ассоциировать с имидазольевым катионом ионной жидкости, сорбированной на поверхности кварцевого капилляра. Образование ассоциатов может происходить за счет ион-дипольных взаимодействий или водородных связей между ИЖ и аналитом [133].

Применение ИЖ различной природы в ВЭЖХ и КЭ представлены в обзорах [50, 62, 83, 134-137].

Таким образом, ионные жидкости в ВЭЖХ и КЭ могут выполнять следующие функции:

- блокировать силанольные гидроксильные группы стационарных фаз и стенок кварцевого капилляра, предотвращая сорбцию основных аналитов;

- создавать хромофорный фон, позволяя обнаруживать не поглощающие в УФ-области спектра соединений в условиях косвенного детектирования;

- формировать псевдостационарную фазу, обеспечивая разделение нейтральных аналитов.

I.3. Ионные жидкости в качестве экстрагентов

I.3.1. Применение ионных жидкостей в жидкостно-жидкостной экстракции

Жидкостно-жидкостная экстракция – распространенный метод извлечения и концентрирования аналитов, основанный на распределении веществ между двумя несмешивающимися жидкостями.

Так, в [138] использовали гидрофобные ионные жидкости для экстракции 3-индолбутановой кислоты из гороха, а в [139] - алифатических кислот (уксусной, гликолевой, молочной, пировиноградной и масляной) из воды.

В [140] было показано, что экстракция фенолов из водных растворов в C_4MImPF_6 протекает количественно при значении pH меньше, чем константы диссоциации этих соединений (pK_a). Экстракция проходила по ионообменному механизму: фенолят-анионы переходили в ионную жидкость, а гексафторфосфат – в водную фазу. Результаты исследования процессов экстракции фенола, тирозола и *n*-гидроксibenзойной кислоты из воды в C_8MImPF_6 оказались сопоставимы с аналогичными для октан-1-ола [141], что указывает на близкую растворяющую способность экстрагентов. Показано, что процессы комплексообразования между дициклогексано-18-краун-6 и аминокислотами благоприятствуют извлечению их в ИЖ C_4MImPF_6 [142]. Такой эффект объясняется ионообменным механизмом экстракции. Изучение влияния pH на процессы извлечения подтвердило

включение протонированной аминогруппы аналитов в полость макроцикла, что облегчало транспорт аминокислоты в фазу ИЖ, в то время как катион ИЖ переходил в водную фазу. Показано, что при $\text{pH}=2$ степени извлечения триптофана (Trp), глицина (Gly), аргинина (Arg) и лизина (Lys) составили 98 %.

В [143] выявлены возможности экстракции аминокислот из водного раствора с участием различных ИЖ (C_4MImPF_6 , C_6MImPF_6 , C_6MImBF_4 , C_8MImBF_4). Для всех ароматических аминокислот коэффициенты распределения оказались выше, чем для алифатических. Большие значения коэффициентов распределения наблюдались в диапазоне $\text{pH} < \text{pK}_{\text{a1}}$, когда аминокислоты заряжены положительно, что независимо подтверждает ионообменный механизм экстракции. На полноту извлечения влияют два основных фактора: гидрофобность аминокислот и сила электростатических взаимодействий между катионом аминокислоты и анионом ионной жидкости. В общем случае, ИЖ, содержащие BF_4^- , лучше экстрагируют кислоты, чем ИЖ с PF_6^- , благодаря большему эффективному заряду. Увеличение длины алкильного радикала ИЖ приводит к уменьшению коэффициентов распределения [143].

В [144] показано, что длина алкильного радикала в молекуле ИЖ влияла и на экстракцию нафтенной кислоты. Так, увеличение длины алкильного радикала в ряду ионных жидкостей C_4MImPhe , C_6MImPhe , C_8MImPhe , $\text{C}_{10}\text{MImPhe}$, $\text{C}_{12}\text{MImPhe}$ приводило к росту степеней извлечения. Ионные жидкости с большим углеводородным радикалом проявляют более сильные основные свойства, что благоприятствует экстракции нафтенной кислоты. С другой стороны, при увеличении длины алкильного радикала растет вязкость ИЖ. Это затрудняет массоперенос, поэтому наибольшие значения степеней извлечения нафтенной кислоты достигнуты с использованием $\text{C}_{10}\text{MImPhe}$ в качестве экстрагента.

В [145] изучалось влияние анионов (ClO_4^- , BF_4^- , PF_6^- , CF_3SO_3^- , NTf_2^-) в составе ИЖ на извлечение алкалоидов (хинина и грамина) из воды. Показано, что при экстракции алкалоидов определяющим является способность аниона образовывать водородные связи с аналитами, поэтому лучшим экстрагентом из испытанных оказалась ионная жидкость $\text{C}_4\text{C}_{10}\text{ImCF}_3\text{SO}_3$.

Описаны и примеры экстракции белков с применением ИЖ. Так, в [146] извлекали четыре белка (альбумин, трипсин, γ -глобулин и цитохром с) из водного раствора с использованием в качестве экстрагентов ионных жидкостей ряда C_nMImBr . Авторы исследовали фазовые равновесия трехфазной системы: *вода-соль-ИЖ* и установили, что при увеличении температуры и длины алкильного радикала степень извлечения белков в ИЖ растет.

В [147] экстрагировали производные тетрациклина и хлорамфеникола методом водной двухфазной экстракции (*aqueous two-phase extraction*, АТРЕ) с совместным применением C_8MImBF_4 и ДДСН (Рис. 19). Когда катионный и анионный детергенты смешиваются в растворе примерно в одинаковом мольном соотношении, происходит самопроизвольное образование двухфазной системы. Движущей силой процесса являются гидрофобные и электростатические взаимодействия между компонентами. Аналиты извлекаются в фазу, насыщенную ПАВ, согласно коэффициентам распределения. Степени извлечения тетрациклина и хлорамфеникола в таком варианте экстракции с применением C_8MImBF_4 составили 85.5-110.9 %.

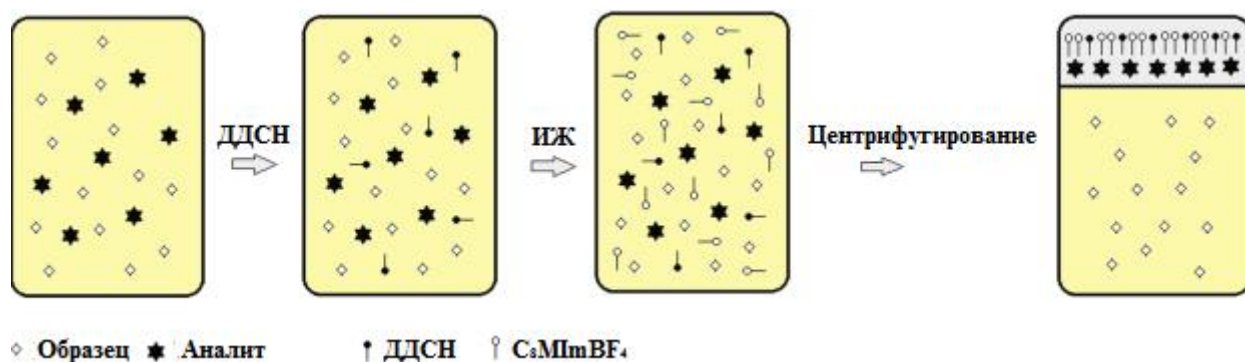


Рис. 19. Схема извлечения аналитов в процессе водной двухфазной экстракции [147].

Таким образом, на экстракцию аналитов в ИЖ влияют природа ИЖ, рН и ионная сила водного раствора, а также соотношение фаз.

1.3.2. Твердофазная экстракция с участием ионных жидкостей

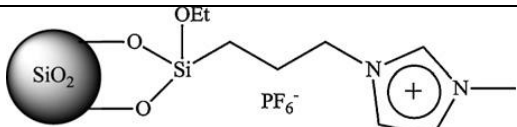
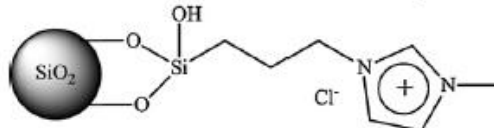
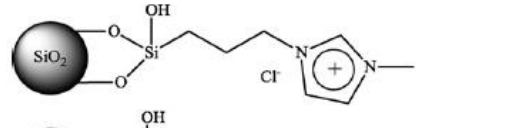
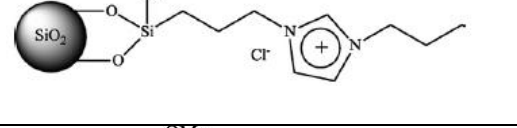
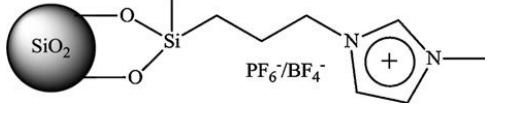
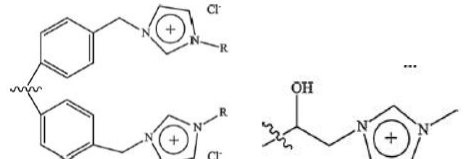
Твердофазная экстракция (ТФЭ) (*solid-phase extraction, SPE*), а точнее сорбционное концентрирование, – еще один метод извлечения и концентрирования аналитов. Экстракция аналитов происходит за счет распределения их между сорбентом и жидкостью. Именно от природы сорбента зависит степень и селективность извлечения. Впервые в ТФЭ сорбенты с иммобилизованными ионными жидкостями применили при концентрировании таншиноновых соединений [148]. Позднее на сорбентах, модифицированных имидазолиевыми ИЖ, проводили извлечение гербицидов [149], молочной кислоты [150], органических кислот, альдегидов и аминов [151], метиловых эфиров жирных кислот [152] и полиненасыщенных жирных кислот [153] (табл. 4).

В [151] изучали процессы сорбционного концентрирования аналитов различной полярности с применением имидазолиевых и *N*-метиylimидазолиевых модифицированных сорбентов. Установлено, что имидазолиевый сорбент стабилен в широком диапазоне рН, в то время как

стабильность N-метилимидазолиевого сорбента сохранялась только в сильноокислой среде. К сожалению, объяснения этому факту авторы не дают. Преобладающим механизмом ТФЭ был ионообменный, а дополнительные гидрофобные и π, π -взаимодействия способствовали увеличению селективности извлечения аналитов.

Авторы в [154] изучали экстракцию кофеина и теофиллина из зеленого чая с применением N-метилимидазолиевых полимеров в качестве сорбентов. Степень извлечения составила 87-90 % для кофеина, и 88-91 % - для теофилина, что значительно выше, чем при сорбционном концентрировании на обращенно-фазовом сорбенте C18.

Таблица 4. Структуры сорбентов для ТФЭ, иммобилизованных ионными жидкостями. Условия и области применения.

Структура сорбента	Условия элюирования	Аналиты	Образец	Степень извлечения	Лит.
	15 мл CH ₂ Cl ₂ :MeOH (95:5, v/v)	Гербициды	Корень солодки, лекарства	87.2-91.5%	[149]
	1 мл 0,25 М раствор HCl	Молочная кислота	Забродивший бульон	91,9 %	[150]
 	(а) 500 мкл CH ₃ COOH:H ₂ O (10:90, v/v) (б) 500 мкл CH ₃ COOH:CH ₃ OH (10:90, v/v)	(а) Органические кислоты (б) Амины и альдегиды	Атмосферный аэрозоль	Органические кислоты: 87-110 %	[151]
	Et ₂ O, гексан	Метилловые эфиры жирных кислот	Биотопливо	85.2-95.7%	[152]
		Полиненасыщенные жирные кислоты	Рыбий жир	93.5%	[153]
	(а) 2 мл CH ₃ CN:H ₂ O (20:80, v/v) (б) 2 мл CH ₃ CN:CH ₃ COOH (90:10, v/v)	Кофеин, теофиллин	Зеленый чай	Кофеин: 87-90 % Теофиллин: 88-91 %	[154]

1.3.3. Процессы микроэкстракции с участием ионных жидкостей

Ионные жидкости нашли применение и в различных вариантах микроэкстракции: экстракция в каплю (*single-drop microextraction*, SDME) [155-157], дисперсионная жидкостно-жидкостная (*dispersive liquid-liquid microextraction*, DLLME) микроэкстракция [158-163] (табл. 5).

Таблица 5. Применение ионных жидкостей в микроэкстракции.

ИЖ	Аналиты	Вариант МЭ	Степень извлечения	Литература
C ₄ MImPF ₆	Гетероциклические амины	SDME	90.1-95.3%	[155]
C ₄ MImPF ₆	Терпены	SDME	-	[156]
C ₄ MImNTf ₂	н.-алканы, н.-спирты, ПАУ	SDME	-	[157]
C ₈ MImPF ₆	Ирбесартан, валсартан	DLLME	83.5-89.6 %	[158]
C ₆ MImPF ₆	Аминогликозиды	DLLME	-	[159]
C ₈ MImPF ₆	Наночастицы серебра	DLLME	84.4 %	[160]
C ₈ MImPF ₆	Меркаптомочевая кислота в моче	DLLME	85-127 %	[161]
C ₈ MImPF ₆	Бисфенолы	DLLME	97.8-103.1%	[162]
C ₄ MImPF ₆	19 лекарственных препаратов (бензодиазепины)	DLLME	-	[163]
C ₆ MImPF ₆	Стероидные гормоны	ILHLLME	95.5-114.6%	[164]
C ₆ MIMBr	Изофлавоны	микроэкстракция с применением ультразвука	85.3-104.0	[165]

В последние годы появился новый вариант микроэкстракции – гомогенная жидкостно-жидкостная микроэкстракция (*homogeneous liquid-liquid microextraction*, HLLME) [166, 167], в которой в качестве экстрагентов могут применяться и гидрофильные ионные жидкости [168]. Гидрофильная ИЖ взаимодействует с ионообменным агентом (например, NH₄PF₆) (*реакция*

метатезиса) с образованием *in situ* гидрофобной ИЖ, формирующей вторую фазу, в которую и извлекаются аналиты [169].

В [170] для извлечения сульфонамидов из образцов крови применяли две ИЖ (C_6MImPF_6 , C_4MImBF_4) с реализацией гомогенной бессолевой экстракции с последующей ИЖ/ИЖ микроэкстракцией (Рис. 20). Степени извлечения составили 90-113 %.

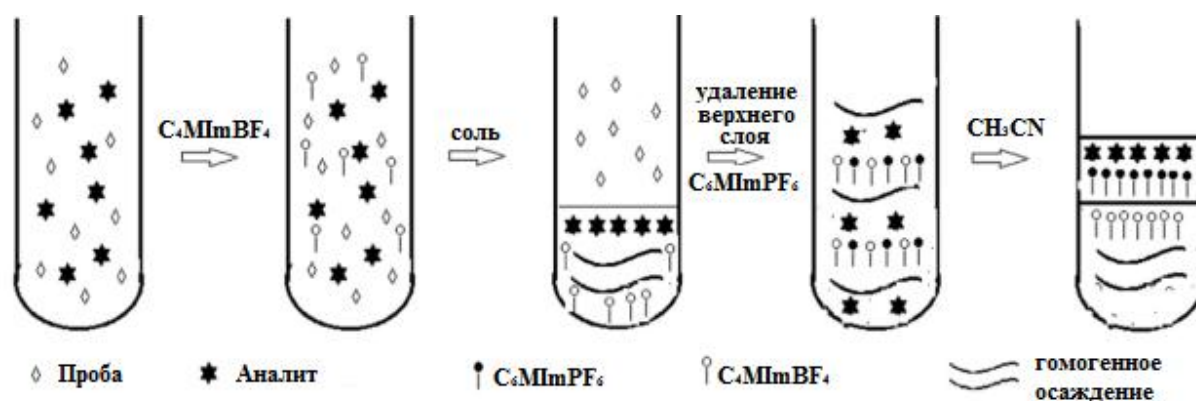


Рис. 20. Схема извлечения аналитов в процессе гомогенной бессолевой экстракции с последующей ИЖ/ИЖ микроэкстракцией [170].

Применению ИЖ в экстракционных процессах посвящены обзоры [171-175].

Несмотря на широкое применение имидазолиевых ионных жидкостей в методах разделения, их роль в анализе биологических сред при определении биологически активных соединений изучена крайне недостаточно.

Перспективным направлением является применение ИЖ в составе электрофоретических систем при определении диагностических маркеров заболеваний нервной и эндокринной систем: биогенных аминов, аминокислот и

стероидных гормонов. Введение в фоновый электролит ИЖ с большими алкильными радикалами в концентрации, выше критической концентрации мицеллообразования, может обеспечить формирование псевдостационарной фазы, способствуя селективному разделению стероидных гормонов в режиме МЭКХ. Ковалентные покрытия на основе ИЖ в сочетании с методами on-line концентрирования могут обеспечить снижение пределов обнаружения аналитов до значений, достаточных для электрофоретического анализа биологических жидкостей. Использование ИЖ в процессах экстракции может облегчить процедуру пробоподготовки и сократить время анализа при определении соединений различной полярности.

Все эти вопросы и предполагалось изучить в данной работе.

ГЛАВА II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

II.1. Оборудование и реактивы

Оборудование

Работа выполнялась на системах капиллярного электрофореза «Капель-105М» со спектрофотометрическим детектором и «Capillary Electrophoresis 7100» с диодной матрицей (Рис. 21). Кварцевый капилляр 50/60 см, внутренний диаметр 50 мкм. Кварцевый капилляр 56/64,5 см, внутренний диаметр 50 мкм.

Серия экспериментов по оценке степеней извлечения аналитов из водной фазы проводилась на жидкостном хроматографе «1200 Series» фирмы «Agilent Technologies» с диодной матрицей, колонка «Eclips Plus C18» фирмы «Agilent» 4,6*100 мм, 3,5 мкм с соответствующей предколонкой, и на жидкостном хроматографе «LC-30 Nexera» фирмы «Shimadzu», колонка Luna C18 (2)» (3.0*150 мм, 3 мкм) с соответствующей предколонкой (Рис. 22).



Рис. 21. Системы капиллярного электрофореза: (а) «Капель-105М» («Люмэкс», Россия), (б) «Capillary Electrophoresis 7100» («Agilent Technologies», США).

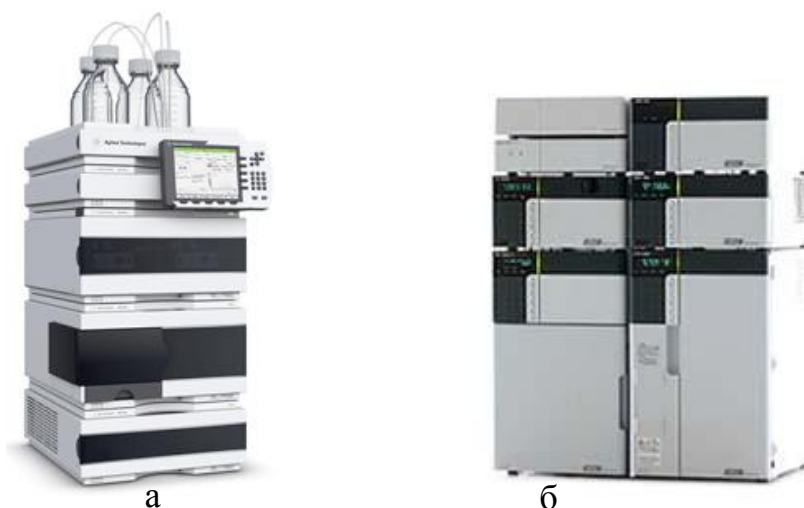


Рис. 22. Высокоэффективные жидкостные хроматографы: (а) «Series 1200» («Agilent Technologies», США), (б) «LC-30 Nexera» («Shimadzu», Япония)

ЯМР-спектрометр «Bruker Spectrospin» AM-500.

Сканирующий электронный микроскоп HITACHI S3400N с боковым детектором Эверхарта-Торнли и кремниевым четырехквadrантным детектором.

Реагенты

Соляная кислота (ос.ч.), гидроксид натрия (ч.д.а.), ортофосфорная кислота (х.ч), дигидрофосфат натрия двухводный (х.ч.), ацетат натрия («Sigma»), борная кислота («реахим», ос.ч), хлорид меди (II) двухводный (х.ч., «Невареактив»), сульфат цинка семиводный (х.ч., «Невареактив»), карбонат натрия (ч.д.а. «Химреактив»), ледяная уксусная кислота («Sigma-Aldrich»), оксид алюминия (Al_2O_3) (> 98 %, «Sigma-Aldrich»). 1-додецил-3-метилимидазолий хлорид ($\text{C}_{12}\text{MImCl}$, Acros organics), 1-гексадецил-3-метилимидазолий хлорид ($\text{C}_{16}\text{MImCl}$, Acros organics), 1-гексил-3-метилимидазолий бис(трифторметил)сульфонилимид ($\text{C}_6\text{MImNTf}_2$, Solvent Innovation), 1-гексил-3-метилимидазолий тетрафторборат (C_6MImBF_4 , Abrc), 3-

метил-1-октилимидазолий тетрафторборат (C_8MImBF_4 , Merck), 3-метил-1-бутилимидазолий хлорид («Sigma-Aldrich») 1-бутил-3-метилимидазолий хлорид C_4MImCl («Sigma-Aldrich»), 3-метил-1-октилимидазолий хлорид C_8MImCl (GmbH & Co), 1-додecil-3-метилимидазолий хлорид $C_{12}MImCl$ (GmbH & Co), цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ, Acros organics). Дихлорметан (>99.7 %, «J.T. Baker»), ацетон (>99.8 %, «Merck»), диметилформамид (ДМФА) (>99.9 %, «J.T. Baker»), 1-бромбутан (99%, «ReagentPlus»), имидазол (> 99%, «Sigma-Aldrich»), (3-глицидоксипропил)триметоксисилан («Sigma»), 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил (DPPH) («Sigma»), этилендиаминтетраацетат диводороддинатрия дигидрат (Na_2EDTA)(«Sigma»), ацетонитрил («криохром», сорт 0). Глицин (Gly), 3,4-дигидроксифенилаланин (DOPA), DL-тирозин (Tyr), L-тирозин (L-Tyr), DL-триптофан (Trp), L-триптофан, L-пролин (L-Pro), L-глутаминовая кислота (L-Glu) кортизол (F), кортизон (E), кортикостерон (B), 11-дезоксикортизол (S), адреналин (A), норадреналин (NA), дофамин (DA), норметанефрин (NMN) фирмы «Sigma-Aldrich», (\pm)-пропранолол гидрохлорид («Sigma»), (S)-(-)-пропранолол гидрохлорид («Sigma»), (\pm)-карведилол («Sigma»), (S)-(-)-карведилол («Sigma»), 18-краун-6 («Sigma»), β -циклодекстрин («Fluka»), (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрин («Sigma-Aldrich»).

Анализируемые объекты: «Анаприлин» - медицинский препарат, действующее вещество - пропранолол. «Карведилол зентива» - медицинский препарат, действующее вещество – карведилол.

Биологические жидкости - образцы мочи.

Вспомогательная посуда

Микрошприцы вместимостью 20, 200, 1000 мкл.

Баня водяная с регулируемой температурой нагрева от 30 до 90 °C.

Колбы мерные 25 мл, 50 мл, 100 мл, 250 мл.

Пробирки типа Эппендорф объемом 1,5 мл и 2 мл.

Стеклянные виалы с полипропиленовыми крышками объемом 1,5 мл.

Полипропиленовые виалы с полипропиленовыми крышками объемом 250 мкл.

Концентратор фирмы «Eppendorf», шейкер, рН-метр фирмы «Hanna», модель HI 2210-2216, весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104, специального класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г.

Приготовление стандартных, рабочих и калибровочных растворов

Стандартные растворы эндогенных стероидных гормонов (кортизол, кортизон, кортикостерон, 11-дезоксикортизол) и β -адреноблокаторов (карведилол и пропранолол) с концентрацией 1 мг/мл готовили растворением точных навесок по 1 мг каждого из аналитов в 1 мл смеси ацетонитрил:вода (1:3, объемн.) во фторопластовых пробирках.

Стандартные растворы катехоламинов (адреналин, норадреналин, дофамин, норметанефрин) и аминокислот (триптофан, тирозин, 3,4-дигидроксифенилаланин, глицин) готовили растворением точных навесок 1 мг каждого из аналитов в 1 мл 0.1 М раствора HCl. Концентрация аминокислот и катехоламинов составляла 1 мг/мл.

Рабочие и калибровочные растворы готовили разбавлением стандартных в необходимое количество раз дистиллированной водой с помощью микрошприца и автоматического дозатора.

Полученные стандартные растворы хранили в морозильной камере при -20°C , а рабочие и калибровочные – в холодильнике при $+4-6^{\circ}\text{C}$.

II.2. Синтез хиральных аминокислотных ионных жидкостей

II.2.1. Синтез аминокислотных ионных жидкостей ([C₂MIm][L-Pro], [C₄MIm][L-Pro], [C₈MIm][L-Pro], [C₁₂MIm][L-Pro])

Синтез аминокислотных ионных жидкостей выполнен согласно [176]. Первоначально с помощью анионообменной смолы Amberlite IR-400 Cl из хлорида 1-алкил-3-метилимидазолия (C₂MImCl, C₄MImCl, C₈MImCl и C₁₂MImCl) получили гидроксид 1-алкил-3-метилимидазолия C_nMImOH (n = 2, 4, 8, 12). При перемешивании водный раствор [C_nMIm]OH добавляли по каплям к водному раствору L-пролина при 0°C. Затем смесь нагревали до 40 °C и осушали методом непрерывной газовой экстракции [177]. Избыток аминокислоты отделяли от продукта с помощью ацетонитрила. В результате была получена аминокислотная ионная жидкость с содержанием воды 3-4%, которую полностью осушали под вакуумом. Полученные соединения охарактеризованы ЯМР- спектрами на ядрах ¹H и ¹³C (Приложение 1-4)

II.2.2. Синтез аминокислотной ионной жидкости [C₄MIm][L-Glu]

Синтез аминокислотной ионной жидкости [C₄MIm][L-Glu] выполнен согласно [178]. Первоначально с помощью анионообменной смолы Amberlite IR-400 Cl из хлорида 1-бутил-3-метилимидазолия (C₄MImCl) получали гидроксид 1-алкил-3-метилимидазолия C₄MImOH. При перемешивании водный раствор [C₄MIm]OH добавляли по каплям к водному раствору L-глутаминовой кислоты при 0°C. Затем смесь перемешивали при охлаждении и нагревали до 96 °C. Остаточную воду выпаривали при пониженном давлении. Для удаления избытка L-глутаминовой кислоты добавляли *ацетонитрил : метанол* (4:1, объемн.), и образовавшийся осадок отфильтровывали. Фильтрат выпаривали, продукт выдерживали в вакуумном эксикаторе в течение двух дней.

Полученное соединение охарактеризовано ЯМР- спектрами на ядрах ^1H и ^{13}C (Приложение 5).

II.3. Синтез ковалентных покрытий на основе ионных жидкостей

II.3.1. Травление кварцевого капилляра

Кварцевый капилляр промывали и заполняли 2 М раствором NaOH. Заполненный капилляр герметизировали и нагревали в термостате при 90°C в течение 2 ч. После охлаждения до комнатной температуры капилляр промывали 0,1 М раствором HCl в течение 5 мин, деионизированной водой 10 мин и ацетоном 15 мин, сушили в термостате при 120 °C в течение 1 ч.

II.3.2. Силанизация кварцевого капилляра

Протравленный капилляр промывали раствором, дегазированным в течение 15 мин в ультразвуковой бане, содержащим 30% (объемн.) (3-глицидоксипропил)триметоксисилана и 0,1% (масс.) 2,2-дифенил-1-пикрилгидразида (DPPH) в N,N-диметилформамиде (ДМФА). Заполненный капилляр герметизировали и нагревали в термостате при 120°C в течение 6 ч. Затем интенсивно промывали ДМФА в течение 10 мин.

II.3.3. Функционализация силанизированного капилляра

Функционализация силанизированного капилляра осуществлялась в два этапа. Сначала силанизированный капилляр заполняли дегазированным в ультразвуковой бане (10 мин) раствором имидазола (25 мг/мл) в ДМФА, герметизировали концы и помещали на 4 ч в термостат при 90 °C, затем избыток имидазола удаляли из капилляра путем последовательной промывки ДМФА и CH_2Cl_2 в течение 10 мин. Далее модифицированный капилляр

заполняли 1-бромбутаном, герметизировали концы и помещали в термостат на 10 часов при 80 °С. Избыток 1-бромбутана удаляли путем промывки капилляра хлористым метиленом в течение 10 мин. Перед началом работы капилляр промывали в течение 10 мин ДМФА, затем 15 мин - дистиллированной водой. Контроль степени ковалентной модификации осуществлялся путем измерения скорости электроосмотического потока (Рис. 23).

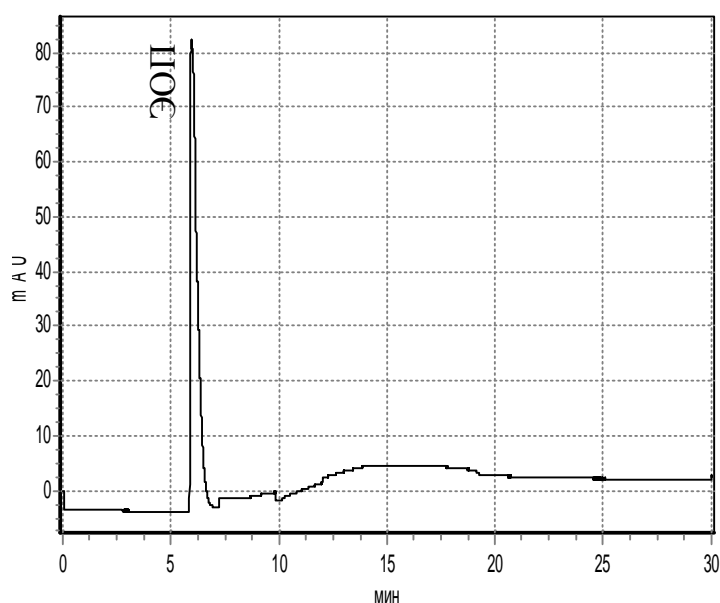


Рис. 23. Электрофореграмма маркера ЭОП. Условия: система капиллярного электрофореза «Капель 105М», фоновый электролит: 10 мМ раствор NaH_2PO_4 , $\text{pH} = 2.0$ (доведенный до требуемого значения pH 0.1 М раствором HCl). Напряжение -20 кВ, детектирование – 220 нм. Маркер ЭОП – 5 %-ный (объемн.) раствор ДМФА в воде.

II.3.4. Оценка стабильности ковалентных покрытий

Оценка стабильности синтезированных покрытий при различных значениях pH осуществлялась по контролю скорости электроосмотического потока. Кварцевый капилляр перед каждым анализом последовательно

промывался в течение 5 мин дистиллированной водой и 10 мин фоновым электролитом (10 мМ при рН равном 2.0, 4.0, 5.6, 7.7, 9.3), затем гидродинамически ($2\text{с} \times 30\text{ мбар}$) вводили 5 %-ный водный раствор ДМФА (Рис. 24).

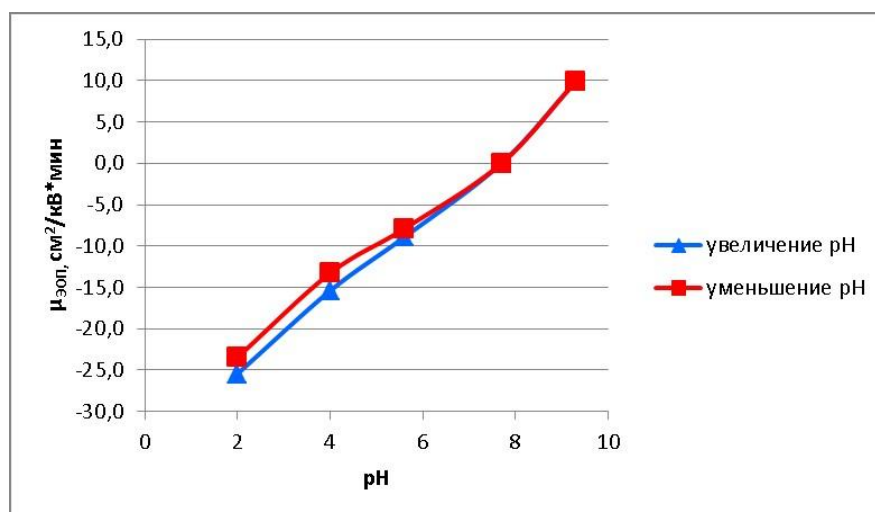


Рис. 24. Зависимость скорости ЭОП от pH фонового электролита.

Условия: система капиллярного электрофореза «Капель 105М», фоновый электролит: 10 мМ NaH_2PO_4 (доведенный до требуемого значения pH 0.1 М раствором HCl) или 10 мМ H_3BO_3 (доведенный до требуемого значения pH 0.1 М раствором NaOH). Напряжение $\pm 20\text{ кВ}$, детектирование – 220 нм. Маркер ЭОП – 5 %-ный (объемн.) раствор ДМФА в воде.

При увеличении pH фонового электролита происходило уменьшение скорости ЭОП, а при pH равном 9.3 генерировался катодный ЭОП, что указывает на наличие остаточных силанольных групп на поверхности кварцевого капилляра. После работы в щелочной среде и при возвращении к pH = 2.0 восстанавливался анодный ЭОП. При pH > 7.0 количество анализов сокращается с 150 до 10.

II.2. Методы исследования

II.2.1. Высокоэффективная хроматография стероидных гормонов и аминокислот

Хроматографическое разделение стероидных гормонов и аминокислот осуществлялось с целью определения степеней извлечения аналитов из водной фазы в гидрофобные ионные жидкости ($C_6MImNTf_2$, C_6MImBF_4 , C_8MImBF_4).

II.2.1.1. Условия хроматографического разделения аминокислот

Работа выполнялась на жидкостном хроматографе «Series 1200» («Agilent Technologies»), колонка «Eclipse Plus C18» (4,6*100 мм, 3,5 мкм) с соответствующей предколонкой.

Подвижная фаза: ацетонитрил-вода, градиентный режим элюирования; диодно-матричный детектор. Температура колонки и детектора: 30 °C. Скорость потока – 0.6 мл/мин, ввод пробы – 20 мкл, время анализа – 12 мин.

Градиент: 0 мин – 2% CH_3CN , 3 мин – 20% CH_3CN , 6 мин – 50% CH_3CN , 7 мин – 2% CH_3CN . $\lambda=270$ нм.

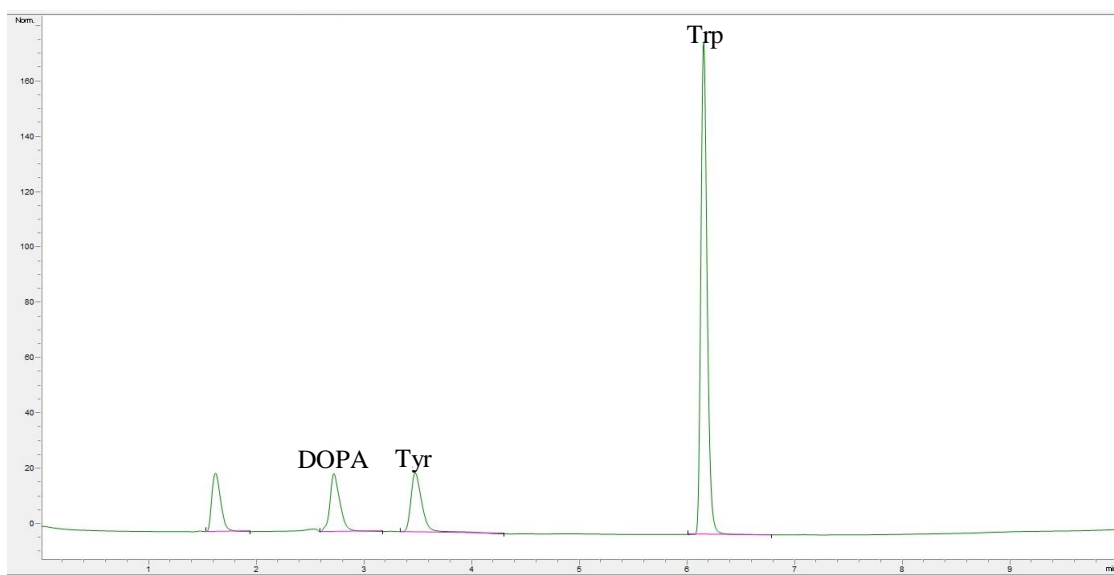


Рис. 25. Хроматограмма стандартного раствора аминокислот.

Аналиты: DOPA – 3,4-дигидроксифенилаланин, Tyr – тирозин, Trp – триптофан. Условия см. в П.2.1.1.

П.2.1.2. Условия разделения стероидных гормонов методом ВЭЖХ

Оборудование: жидкостный хроматограф «Series 1200» («Agilent Technologies»), колонка «Eclipse Plus C18» (4,6*100 мм, 3,5 мкм) с соответствующей предколонкой.

Подвижная фаза: ацетонитрил-вода, градиентный режим элюирования; диодно-матричный детектор. Температура колонки и детектора: 30°C. Скорость потока – 0.2 мл/мин, ввод пробы – 20 мкл, время анализа – 17 мин.

Градиент: 0 мин – 50% CH₃CN, 0.2 мл/мин; 6 мин – 80% CH₃CN, 0.3 мл/мин; 10 мин – 80% CH₃CN, 0.3 мл/мин; 12 мин – 50% CH₃CN, 0.2 мл/мин. λ = 240 нм.

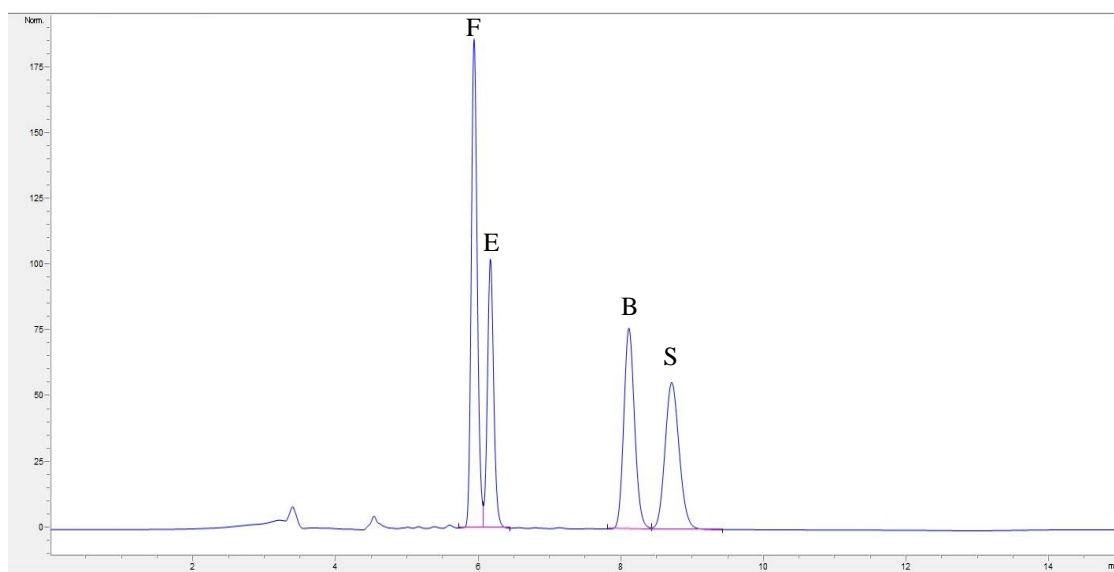


Рис. 26. Хроматограмма стандартного раствора стероидных гормонов. Аналиты: F – кортизол, E – кортизон, B – кортикостерон, S – 11-дезоксикортизон. Условия см. в II.2.1.2.

Для оценки степеней извлечения стероидных гормонов из водной фазы в процессе дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции использовалось следующее оборудование: жидкостный хроматограф «LC-30 Nexera» («Shimadzu»), колонка «Luna C18 (2)» (3.0*150 мм, 3 мкм) с соответствующей предколонкой.

Подвижная фаза: ацетонитрил-вода, изократический режим элюирования; диодно-матричный детектор. Температура колонки и детектора: 30°C. Скорость потока – 0.3 мл/мин, ввод пробы – 20 мкл, время анализа – 15 мин. Подвижная фаза: 35% CH₃CN. λ = 240 нм.

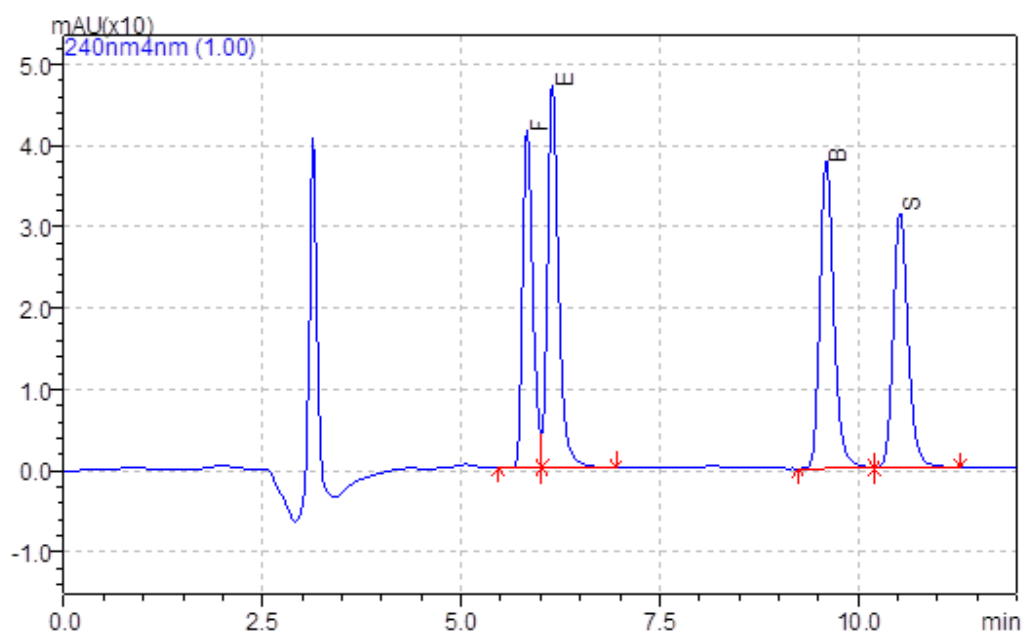


Рис. 27. Хроматограмма стандартного раствора стероидных гормонов. Аналиты: F – кортизол, E – кортизон, В – кортикостерон, S – 11-дезоксикортизон. Условия см. в П.2.1.2.

П.2.2. Электрофоретические эксперименты

П.2.2.1. Подготовка капилляра к работе

Новый кварцевый капилляр кондиционировали путем промывки 1 М раствором NaOH в течение 20 мин, затем дистиллированной водой в течение 15 мин при давлении 950-1000 мбар. Между анализами капилляр промывали 0,1 М раствором NaOH (при дальнейшем использовании боратного буфера) или 0,1 М раствором HCl (для фосфатного буфера) в течение 2 мин, затем 3 мин водой и 5 мин фоновым электролитом.

П.2.2.2. Приготовление буферных растворов

- *фосфатный буферный раствор, 0.2 М.* Для приготовления 50 мл буферного раствора взвешивали 1.56 г дигидрофосфата натрия ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Для получения требуемого значения pH к раствору добавляли 1М раствор HCl .

- боратный буферный раствор, 0.2 М. Для приготовления 50 мл буферного раствора взвешивали 0.62 г борной кислоты (H_3BO_3). Для получения требуемого значения рН к раствору добавляли 2 М раствор гидроксида натрия.

II.2.2.3. Условия электрофоретического разделения

Условия электрофоретического разделения аминокислот и катехоламинов при использовании ионных жидкостей в качестве динамических модификаторов

Фоновый электролит: 10 – 75 мМ фосфатный (рН = 2.0, доведенный до требуемого значения 0.1 М раствором соляной кислоты) или боратный (рН = 9.3) буферные растворы с добавкой ионных жидкостей ($\text{C}_{12}\text{MImCl}$ или $\text{C}_{16}\text{MImCl}$) или ЦТАБа (0-150 мМ). Напряжение: ± 20 кВ. Температура термостатирования: 20 °С. Время ввода пробы: 3 – 20 с, давление ввода: 30-50 мбар.

Условия электрофоретического разделения стероидных гормонов в режиме МЭКХ при использовании ионных жидкостей в качестве псевдостационарных фаз.

Фоновый электролит: 10 – 150 мМ фосфатный (рН = 2.0, доведенный до требуемого значения 0.1 М раствором соляной кислоты) буферный раствор с добавкой ионной жидкости $\text{C}_{16}\text{MImCl}$ (0.5-75 мМ), β -циклодекстрина (β -ЦД) (1-25 мМ) или ДДСН (1-5) мМ. Напряжение: -20 кВ. Температура термостатирования: 20 °С. Время ввода пробы: 3 – 20 с, давление ввода: 30-50 мбар.

Условия хирального электрофоретического разделения энантиомеров аминокислот с участием ионных жидкостей ряда $[C_nMIm][L-Pro]$ ($n=2, 4, 8, 12$)

Фоновый электролит: 10 – 100 мМ боратный (pH 7.0 - 13.0, довели до требуемого значения pH 2 М раствором гидроксида натрия) буферный раствор с добавкой от 5 до 30 мМ $[C_4MIm][L-Pro]$ и 2.5-15 мМ $CuCl_2$ или 10 мМ $ZnSO_4$. Напряжение: +10-30 кВ. Температура термостатирования капилляра: 30 °С. Время ввода пробы: 5 с, давление ввода: 50 мбар.

Условия разделения энантиомеров β -адреноблокаторов

Фоновый электролит: 20 мМ фосфатный (pH 2.0) буферный раствор с добавкой 5 мМ 2-HP- β -CD и от 0 до 5 мМ $[C_4MIm][L-Pro]$. Напряжение: +10-30 кВ. Температура термостатирования капилляра: 30 °С. Время ввода пробы: 5 с, давление ввода: 50 мбар.

Условия внутрикапиллярного концентрирования аминокислот и катехоламинов на синтезированных покрытиях

Фоновый электролит: 10 мМ раствор NaH_2PO_4 (pH = 2.0, доведенный до требуемого значения 0.1 М раствором соляной кислоты). Напряжение: -20 кВ. Температура термостатирования капилляра: 20 °С. Время ввода пробы: 2-100 с, давление ввода: 30-50 мбар.

Условия on-line концентрирования аминокислот и катехоламинов на синтезированных покрытиях в режиме МЭКХ

Фоновый электролит: 10 мМ раствор NaH_2PO_4 (pH = 2.0, доведенный до требуемого значения 0.1 М раствором соляной кислоты), 5-75 мМ ДДСН, Напряжение: +20 кВ. Температура термостатирования капилляра: 20 °С. Время

ввода пробы: 2-100 с, давление ввода: 30-50 мбар или напряжение ввода пробы: 10-20 кВ.

Условия электрофоретического разделения стероидных гормонов в режиме МЭКХ при определении в образцах мочи

Фоновый электролит: 25 мМ раствор NaH_2PO_4 (рН = 2.0, доведенный до требуемого значения 0.1 М раствором соляной кислоты), 25 мМ раствор ДДСН, 5 М раствор мочевины. Напряжение: -20 кВ. Температура термостатирования капилляра: 20 °С. Время ввода пробы: 5 с, давление ввода: 50 мбар.

II.3. Жидкостная экстракция

II.3.1. Экстракция аминокислот в ионные жидкости

II.3.1.1. Жидкостно-жидкостная экстракция аминокислот в ионные жидкости $C_6\text{MImNTf}_2$, $C_6\text{MImBF}_4$, $C_8\text{MImBF}_4$

В пробирки типа Эппендорф вносили 25 мкл стандартных растворов аминокислот, 25 мкл 1 М раствора HCl , 900 мкл дистиллированной воды и тщательно перемешивали. Затем добавляли 100, 250, 500, 1000 мкл ионной жидкости и ставили на 1 час в шейкер при температуре 30 °С (табл. 6).

Расчет степеней извлечения осуществляли по формуле:

$$\text{Степень извлечения} = 1 - \frac{C_e}{C_0}, \quad (3)$$

где C_e – концентрация аналита в водной фазе после экстракции (мкг/мл), C_0 – начальная концентрация аналита (мкг/мл).

Таблица 6. Степени извлечения (%) аминокислот (25 мкг/мл) в ионные жидкости при различном соотношении фаз *ИЖ:вода* (объемн.) (n=3, p=0.95)

Аналит	Соотношение фаз ИЖ: вода, объемн.			
	1:10	1:4	1:2	1:1
	C₆MImNTf₂			
3,4-Дигидроксифенилаланин	6±2	12±2	94±6	95±5
Тирозин	7±2	20±3	90±7	93±6
Триптофан	10±2	43±2	98±2	99±1
	C₆MImBF₄			
3,4-Дигидроксифенилаланин	6±2	12±3	18±2	26±3
Тирозин	7±2	20±5	33±3	47±5
Триптофан	13±2	43±7	69±7	82±8
	C₈MImBF₄			
3,4-Дигидроксифенилаланин	0±1	0±1	0±1	1±1
Тирозин	0±1	7±2	10±2	13±2
Триптофан	11±2	35±4	50±5	70±6

II.3.1.2. Жидкостно-жидкостная экстракция аминокислот в ионную жидкость C₆MImNTf₂ с добавкой 18-краун-6

В пробирки типа Эппендорф вносили 25 мкл стандартных растворов аминокислот, 25 мкл 1 М раствора HCl, 50, 100, 250 и 500 мкл 0.1 М раствора краун-эфира 18-К-6, доводили объем раствора до 1 мл дистиллированной водой. Затем добавляли 250 мкл ионной жидкости C₆MImNTf₂ и ставили на 1 час в шейкер при температуре 30 °C (табл. 7).

Таблица 7. Степени извлечения (%) аминокислот (25 мкг/мл) из водной фазы в ионную жидкость C₆MImNTf₂ в зависимости от концентрации 18-краун-6 в водной фазе (n=3, p=0.95).

Аминокислота	Концентрация 18-краун-6, мМ				
	0	5	10	25	50
3,4-Дигидроксифенилаланин	12±2	85±9	88±9	91±5	99±1
Тирозин	20±2	80±8	97±2	99±1	99±1
Триптофан	43±4	97±3	98±2	99±1	99±1

II.3.1.3. Жидкостно-жидкостная экстракция аминокислот в ионную жидкость $C_6MImNTf_2$ при различном значении pH водной фазы

В пробирки типа Эппендорф вносили 25 мкл стандартных растворов аминокислот, 900 мкл дистиллированной воды. Затем раствором соляной кислоты или гидроксидом натрия доводили pH до требуемого значения и добавляли дистиллированную воду до объема 1 мл. Далее вносили 1000 мкл ионной жидкости $C_6MImNTf_2$ и ставили на 1 час в шейкер при температуре 30 °C (табл. 8).

Таблица 8. Степени извлечения (%) аминокислот (25 мкг/мл) в ионную жидкость $C_6MImNTf_2$ в зависимости от pH водной фазы (n=3, p=0.95).

Аминокислота	Значение pH водной фазы					
	1.6±0.1	3.0±0.2	4.0±0.2	5.0±0.2	6.0±0.2	7.0±0.2
DOPA	95±5	80±5	39±4	17±3	8±2	2±1
Tyr	93±6	76±5	44±4	21±3	10±2	3±1
Trp	99±1	93±6	64±5	29±4	12±2	5±1

II.3.2. Экстракция кортикостероидов в ионные жидкости

II.3.2.1. Жидкостно-жидкостная экстракция кортикостероидов в ионные жидкости $C_6MImNTf_2$, C_6MImBF_4 , C_8MImBF_4 .

В пробирки типа Эппендорф вносили 5 мкл стандартных растворов кортикостероидов, 980 мкл дистиллированной воды и тщательно перемешивали. Затем добавляли 100, 250, 500, 1000 мкл ионной жидкости и ставили на 1 час в шейкер при температуре 30 °C.

Степени извлечения аналитов оценивали по формуле (3) (табл. 9).

Таблица 9. Степени извлечения (%) кортикостероидов (5 мкг/мл) в ионные жидкости при разном соотношении фаз *ИЖ:вода* (n=3, p=0.95).

Гормон	Соотношение фаз ИЖ:вода, объемн.			
	1:10	1:4	1:2	1:1
	C₆MImNTf₂			
Кортизол (F)	17±2	31±4	41±5	59±7
Кортизон (E)	51±5	71±7	89±8	97±3
Кортикостерон (B)	75±6	88±7	94±6	98±2
11-Дезоксикортизон (S)	76±6	88±7	94±6	98±2
	C₆MImBF₄			
Кортизол (F)	36±4	75±7	86±6	94±5
Кортизон (E)	62±6	86±7	95±5	98±2
Кортикостерон (B)	70±6	91±5	96±4	98±2
11-Дезоксикортизон (S)	78±6	95±5	97±3	98±2
	C₈MImBF₄			
Кортизол (F)	53±5	93±6	95±5	97±3
Кортизон (E)	42±4	96±4	97±3	98±2
Кортикостерон (B)	94±6	97±3	98±2	98±2
11-Дезоксикортизон (S)	95±5	97±3	98±2	98±2

II.3.2.2. Жидкостно-жидкостная экстракция кортикостероидов в ионную жидкость C₈MImBF₄ с добавкой циклодекстринов в водную фазу

В пробирки типа Эппендорф вносили 5 мкл стандартных растворов кортикостероидов, добавляли 100, 200, 400, 800 мкл 10 мМ раствора β-циклодекстрина (β-ЦД) или его производного (ГП-β-ЦД), доводили объем до 1 мл дистиллированной водой, тщательно перемешивали. Вносили в вialу 100 мкл ионной жидкости и ставили на 1 час в шейкер при температуре 30 °С (табл. 10).

Таблица 10. Степени извлечения (%) кортикостероидов (5 мкг/мл) в ионную жидкость C_8MImBF_4 с добавкой β -циклодекстрина или его производного в водной фазе (n=3, p=0.95).

Гормон	Концентрация β -ЦД в водной фазе, мМ				
	0	1	2	4	8
Кортизол (F)	53±5	28±3	13±2	1±1	1±1
Кортизон (E)	42±4	28±3	23±3	20±3	15±2
Кортикостерон (B)	94±6	80±7	56±6	53±5	48±5
11-Дезоксикортизон (S)	95±5	87±7	79±7	71±7	60±6
	Концентрация ГП- β -ЦД в водной фазе, мМ				
	0	1	2	4	8
Кортизол (F)	53±5	20±3	16±3	10±2	6±2
Кортизон (E)	42±4	56±6	52±6	49±5	44±5
Кортикостерон (B)	94±6	63±6	59±6	55±6	50±5
11-Дезоксикортизон (S)	95±5	86±6	78±5	70±6	65±6

II.3.2.3. Обратная экстракция кортикостероидов из ионной жидкости C_8MImBF_4 в водную фазу с добавкой циклодекстринов

В пробирки типа Эппендорф вносили 5 мкл стандартных растворов кортикостероидов, 980 мкл дистиллированной воды и тщательно перемешивали. Затем добавляли 1000 мкл ионной жидкости и ставили на 1 час в шейкер при температуре 30 °C. Затем водную фазу отделяли от органической путем декантации.

В стеклянные вials вносили 250, 500, 750, 1000 мкл 10 мМ раствора β -циклодекстрина или его гидроксипропилпроизводного, доводили объем до 1 мл дистиллированной водой, тщательно перемешивали. Полученные таким образом растворы вносили в вial, содержащую органическую фазу, и ставили на 1 час в шейкер при температуре 30 °C (табл. 11).

Таблица 11. Степени извлечения (%) кортикостероидов (5 мкг/мл) из ионной жидкости C_8MImBF_4 в водную фазу с добавкой β -циклодекстрина и его гидроксипропилпроизводного ($n=3$, $p=0.95$).

Гормон	Концентрация β -ЦД в водной фазе, мМ				
	0	2.5	5.0	7.5	10.0
Кортизол (F)	0 \pm 1	5 \pm 1	6 \pm 2	6 \pm 2	7 \pm 2
Кортизон (E)	0 \pm 1	2 \pm 1	4 \pm 2	4 \pm 2	4 \pm 2
Кортикостерон (B)	0 \pm 1	3 \pm 1	3 \pm 1	3 \pm 1	4 \pm 2
11-Дезокисортизон (S)	0 \pm 1	4 \pm 2	5 \pm 2	6 \pm 2	7 \pm 1
Гормон	Концентрация НР- β -ЦД в водной фазе, мМ				
	0	2.5	5.0	7.5	10.0
Кортизол (F)	0 \pm 1	5 \pm 1	6 \pm 2	6 \pm 2	8 \pm 2
Кортизон (E)	0 \pm 1	3 \pm 1	4 \pm 2	4 \pm 2	4 \pm 2
Кортикостерон (B)	0 \pm 1	3 \pm 1	3 \pm 1	3 \pm 1	4 \pm 2
11-Дезокисортизон (S)	0 \pm 1	5 \pm 2	7 \pm 2	8 \pm 2	9 \pm 2

II.3.3. Дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция стероидных гормонов с участием ионной жидкости C_8MImBF_4

В мерные пробирки вместимостью 10 мл вносили 5 мкл рабочих растворов (100 мкг/мл) кортикостероидов и доводили дистиллированной водой до 5 мл. К пробе шприцем прибавляли 1 мл органического растворителя (метанол, ацетонитрил, ацетон), содержащего 100 мкл C_8MImBF_4 . Содержимое пробирки встряхивали 1 мин и выдерживали 10 мин в ультразвуковой ванне. Разделение дисперсной системы проводили центрифугированием в течение 15 мин при 4000 об/мин. Оценку степеней извлечения проводили по формуле (3) с учетом разбавления (табл. 12).

Для оценки влияния объема диспергатора на степени извлечения стероидных гормонов к пробе шприцем прибавляли 100, 250, 500, 1000, 1500, мкл ацетона, содержащего 100 мкл C_8MImBF_4 (табл. 13). Для оценки влияния объема C_8MImBF_4 на степень извлечения кортикостероидов к пробе шприцем прибавляли 500 мкл ацетона, содержащего 50, 100, 150, 200, 250 мкл C_8MImBF_4

(табл. 14). Затем содержимое пробирки подвергали процедурам, описанным выше.

Таблица 12. Степени извлечения (%) стероидных гормонов в ионную жидкость C_8MImBF_4 в процессе дисперсионной микроэкстракции с использованием различных диспергаторов (n=3, p=0.95).

Аналит	Метанол	Ацетонитрил	Ацетон
Кортизол (F)	33±3	50±5	57±6
Кортизон (E)	38±4	44±5	58±6
Кортикостерон (B)	51±6	62±7	82±7
11-Дезокисортизон (S)	51±6	65±6	84±8

Таблица 13. Степени извлечения (%) стероидных гормонов в ионную жидкость C_8MImBF_4 в зависимости от добавленного объема ацетона (n=3, p=0.95).

Аналит	100 мкл	250 мкл	500 мкл	1000 мкл	1500 мкл
Кортизол (F)	11±2	42±5	62±6	57±6	31±5
Кортизон (E)	8±2	46±5	64±6	58±6	38±6
Кортикостерон (B)	46±5	69±7	87±7	82±7	61±7
11-Дезокисортизон (S)	48±5	77±7	89±8	84±8	59±7

Таблица 14. Степени извлечения (%) стероидных гормонов в ионную жидкость C_8MImBF_4 в зависимости от ее объема (n=3, p=0.95).

Аналит	50 мкл	100 мкл	150 мкл	200 мкл	250 мкл
Кортизол (F)	13±2	62±6	68±7	69±7	73±7
Кортизон (E)	17±3	64±6	72±7	74±7	78±7
Кортикостерон (B)	31±4	87±7	89±7	86±6	87±7
11-Дезокисортизон (S)	31±4	89±7	91±6	92±5	92±6

II.4. Пробоподготовка образцов мочи

II.4.1. Пробоподготовка образцов мочи для электрофоретического определения аминокислот

В пробирку типа Эппендорф отбирали 1 мл мочи, вносили с помощью дозатора 100 мкл 1 М раствора соляной кислоты. Тщательно перемешивали и добавляли 750 мкл ионной жидкости $C_6MImNTf_2$. Смесь помещали в шейкер на 1 час при температуре 30 °С. Затем центрифугировали в течение 3 мин (3000 об/мин). Отбирали нижний слой. Для обратной экстракции аминокислот в водную фазу добавляли 1 мл 0.3 М боратного буферного раствора (pH=9.3), ставили в шейкер на 1 час при температуре 30 °С. Далее центрифугировали, отбирали водную фазу и высушивали под вакуумом масляного насоса. Полученный остаток растворяли в 0.25 мл 0.1 М раствора соляной кислоты и подвергали электрофоретическому анализу.

II.4.2. Пробоподготовка образцов мочи для электрофоретического определения катехоламинов

Процедура пробоподготовки мочи основана на ранее описанной методике сорбционного концентрирования с применением оксида алюминия [179] с некоторыми модификациями.

К 5 мл образца мочи добавляли в качестве антиоксиданта 1.2 мл 50 мМ водного раствора $Na_2ЭДТА$, затем 1 М водным раствором Na_2CO_3 довели pH образца до 8,5 и быстро вносили 25 мг прокаленного оксида алюминия, перемешивали 2 мин и отфильтровывали с использованием системы Preppu с мембранным насосом. Далее сорбент промывали дистиллированной водой (2 × 3 мл) и элюировали аналиты 0.5 мл 1М раствором уксусной кислоты.

II.4.3. Пробоподготовка образцов мочи для электрофоретического определения стероидных гормонов

В мерные пробирки вместимостью 10 мл вносили 5 мл мочи, к пробе шприцем прибавляли 0.5 мл ацетона, содержащего 150 мкл ионной жидкости C_8MImBF_4 . Содержимое пробирки встряхивали 1 мин и выдерживали 10 мин в ультразвуковой ванне. Разделение дисперсной системы проводили центрифугированием в течение 15 мин при 4000 об/мин. Затем 50 мкл нижней фазы переносили в пробирки типа Эппендорф и добавляли 50 мкл MeOH.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Метод капиллярного электрофореза с УФ-детектированием в его двух основных вариантах – капиллярный зонный электрофорез и мицеллярная электрокинетическая хроматография – получил широкое распространение при определении ионных и нейтральных соединений благодаря высокой эффективности, экспрессности, возможности сочетания КЗЭ с масс-спектрометрическим детектором. Однако при решении медико-биологических задач возникают проблемы: сорбция основных аналитов (аминов, аминокислот, катехоламинов, нуклеозидов, пептидов и белков) на стенках кварцевого капилляра, что проявляется в снижении эффективности, и низкая чувствительность.

Решением этих проблем может быть сочетание процессов *on-line* концентрирования с применением в составе фонового электролита веществ, способных блокировать группы -ОН кварцевого капилляра, тем самым устраняя или снижая сорбцию определяемых соединений. Подобный подход может сопровождаться ростом эффективности и селективности разделения, а также снижением пределов обнаружения до значений, достаточных для определения минорных и при этом диагностически важных аналитов в биологических жидкостях.

В связи с этим интересные перспективы открываются при использовании в капиллярном электрофорезе имидазолиевых ионных жидкостей. Они прекрасно растворяются в водно-органических системах и могут, в принципе, выполнить различные аналитические функции: за счет положительно заряженного имидазолиевого катиона изменять состояние поверхности стенок кварцевого капилляра, взаимодействовать с аналитами, изменяя их

миграционные характеристики, выполнить роль экстрагентов для гидрофильных и гидрофобных аналитов.

ГЛАВА III. ИОННЫЕ ЖИДКОСТИ В КАЧЕСТВЕ ДИНАМИЧЕСКИХ МОДИФИКАТОРОВ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИХ СИСТЕМ

В сфере наших интересов имидазолиевые ИЖ с алкильными радикалами додецил- и гексадецил- (Рис. 28). Подобно ПАВ, при определенных концентрациях они могли бы образовывать мицеллы с формированием *псевдостационарной* фазы, что позволило бы достичь разделения стероидных гормонов, которые в условиях КЗЭ мигрируют вместе с ЭОП. Наличие имидазолиевого катиона в их составе могло бы способствовать модификации отрицательно заряженных стенок кварцевого капилляра, тем самым предотвращая сорбцию основных аналитов, в качестве которых нами выбраны биологически активные вещества, играющие важную роль при диагностике заболеваний нервной и эндокринной систем – аминокислоты и биогенные амины (Рис. 29).

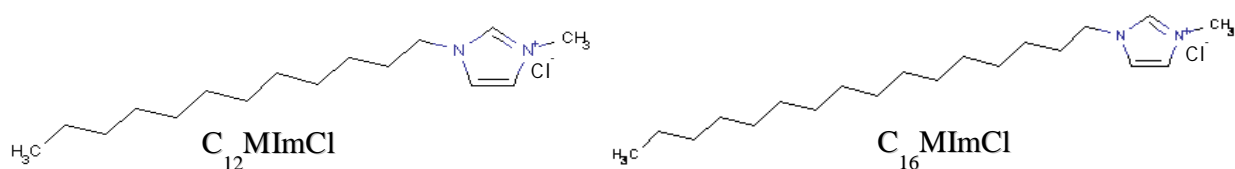


Рис. 28. Структуры исследуемых ионных жидкостей: $C_{12}MImCl$ – 1-додецил-3-метилимидазолий хлорид, $C_{16}MImCl$ – 1-гексадецил-3-метилимидазолий хлорид.

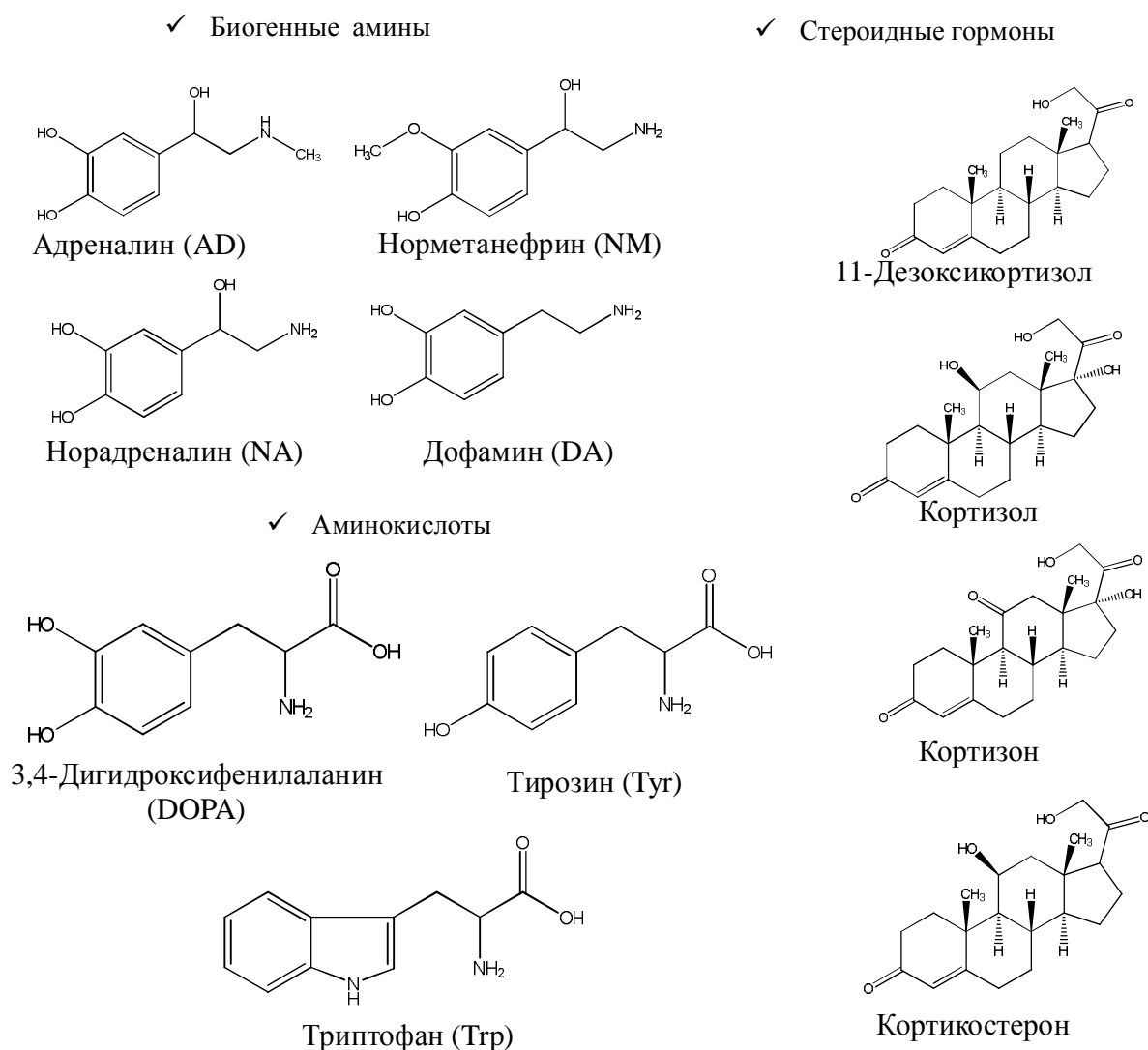


Рис. 29. Структуры модельных аналитов.

Исследовано влияние растворов ионных жидкостей $C_{12}MImCl$ и $C_{16}MImCl$ на электрофоретические параметры миграции аминокислот и катехоламинов при $pH = 2.0$ [180, 181].

Показано, что при введении $C_{12}MImCl$ в состав фонового электролита происходит динамическая модификация стенок кварцевого капилляра, что подтверждалось наличием обращенного ЭОП. Установлена зависимость

скорости ЭОП от концентрации ионной жидкости в фоновом электролите (Рис. 30). Если концентрация ИЖ ниже критической концентрации мицеллообразования, скорость ЭОП увеличивается, а затем – уменьшается за счет формирования мицелл.

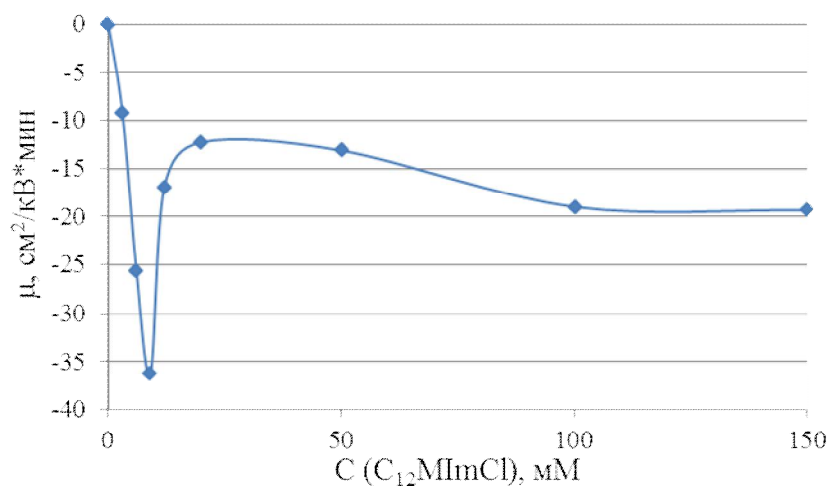


Рис. 30. Зависимость скорости электроосмотического потока от концентрации C₁₂MImCl в фоновом электролите.

Условия: система капиллярного эллектрофореза «Капель-105М». Фоновый электролит: 10 мМ раствор NaH₂PO₄, pH = 2.0 (доведенный до требуемого значения 0.1 М раствором HCl), C₁₂MImCl. U=-20 кВ, ввод пробы: 2с×30мбар; λ: 220 нм. Маркер ЭОПа – 5%-ный (объемн.) раствор ДМФА в воде.

Аминокислоты и катехоламины в кислой среде заряжены положительно и в условиях КЗЭ, когда ЭОП подавлен, мигрируют в направлении катода за счет собственных электрофоретических подвижностей (Рис. 31).

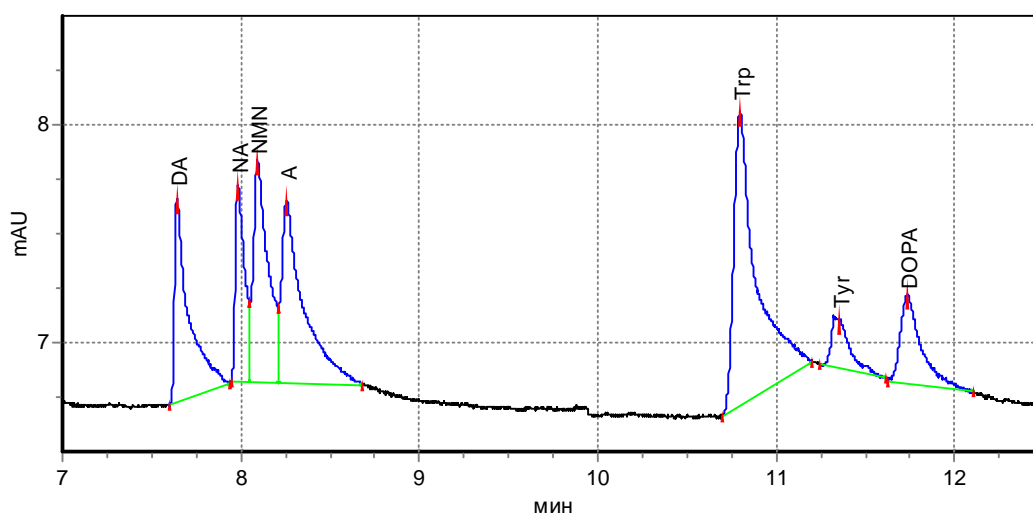


Рис. 31. Электрофореграмма смеси аминокислот и катехоламинов.

Условия: система капиллярного элелектрофореза «Капель-105М». Фоновый электролит: 10 мМ раствор NaH_2PO_4 , $\text{pH} = 2.0$ (доведенный до требуемого значения 0.1 М раствором HCl). $U = +20$ кВ, ввод пробы: $2\text{с} \times 30\text{мбар}$; λ : 220 нм. Маркер ЭОПа – 5%-ный раствор ДМФА в воде. Аналиты: DA – дофамин, NA – норадреналин, NMN – норметанефрин, А – адреналин, Trp – триптофан, Tyr – тирозин, DOPA – 3,4-дигидроксифенилаланин.

При введении ионной жидкости $\text{C}_{12}\text{MImCl}$ (>3 мМ) в состав фонового электролита наблюдалась динамическая модификация стенок кварцевого капилляра, сопровождаемая увеличением эффективности как в случае аминокислот, так и катехоламинов в 2-3 раза (Рис. 32). Это обусловлено следующим: ионная жидкость сорбируется на стенках кварцевого капилляра, придавая им положительный заряд; в результате генерируется анодный ЭОП. Чем больше молекул ИЖ адсорбировалось, тем выше скорость ЭОП и тем сильнее электростатическое отталкивание положительно заряженных аналитов от стенок кварцевого капилляра. Эта тенденция особенно выражена для триптофана и дофамина, поскольку эти аналиты проявляют наиболее основные свойства.

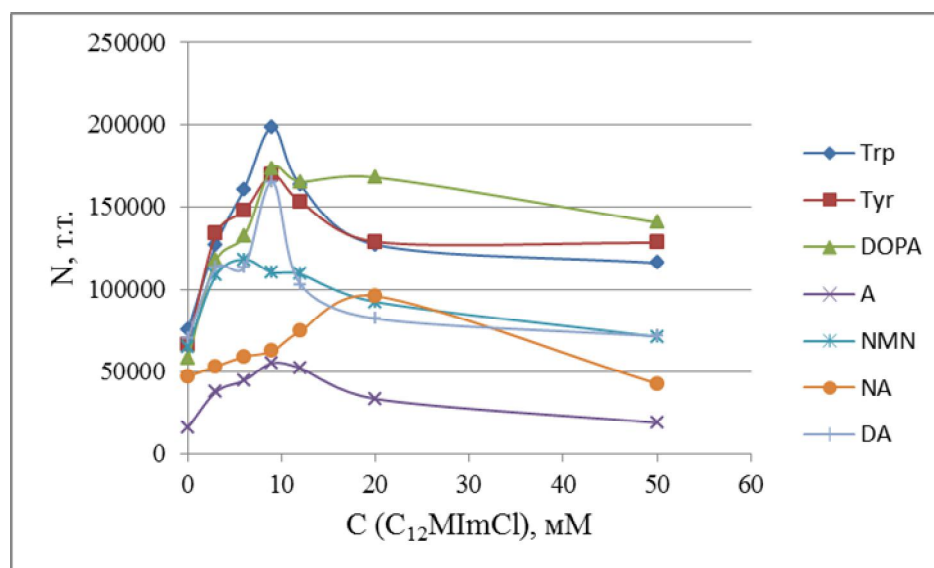


Рис. 32. Зависимость эффективности (N) от концентрации C₁₂MImCl в составе фонового электролита при электрофоретическом разделении аминокислот и биогенных аминов. Условия: см. Рис. 30.

При концентрации ионной жидкости, превышающей значение ККМ, реализуется режим мицеллярной электрокинетической хроматографии. В этом случае увеличивается селективность разделения аминокислот и катехоламинов (табл. 15).

Оценку разделения проводили по значениям факторов разрешения (R_s):

$$R_s = \frac{2 \cdot (t_2 - t_1)}{w_2 + w_1}, \quad (5)$$

где t_1 и t_2 – времена миграции аналитов, w_1 и w_2 – ширина пиков аналитов.

Полученные результаты сопоставлены с влиянием традиционно используемого катионного детергента – цетилтриметиламмоний бромида (ЦТАБ) (табл. 15).

Таблица 15. Значения факторов разрешения (R_s) аминокислот и биогенных аминов с использованием различных ионных жидкостей ($C_{12}MImCl$ и $C_{16}MImCl$) и ЦТАБ фоновом электролите.

	Фактор разрешения (R_s)			
	Без ИЖ	150 мМ $C_{12}MImCl$	5 мМ $C_{16}MImCl$	25 мМ ЦТАБ
Trp/Tyr	2.09±0.05	13.22±0.08	12.34±0.08	1.08±0.02
Tyr/DOPA	1.08±0.02	2.04±0.05	1.89±0.04	1.13±0.03
		150 мМ $C_{12}MImCl$	3 мМ $C_{16}MImCl$	6 мМ ЦТАБ
DA/NA	1.03±0.02	3.26±0.06	7.11±0.07	1.10±0.03
NA/NMN	1.03±0.02	1.15±0.03	2.52±0.05	1.03±0.02
NMN/A	1.07±0.02	1.08±0.02	2.16±0.05	1.04±0.01

ККМ ($C_{12}MImCl$) = 12-15 мМ, ККМ ($C_{16}MImCl$) = 1.2 мМ, ККМ (ЦТАБ) = 0.9 мМ.

При увеличении длины алкильного радикала в составе ИЖ критическая концентрация мицеллообразования (ККМ) уменьшается, что приводит к более высоким факторам разрешения в случае $C_{16}MImCl$ по сравнению с $C_{12}MImCl$ при одинаковом их содержании в фоновом электролите. Различия в поведении ИЖ и ЦТАБ могут быть обусловлены следующими причинами: в системе с $C_{16}MImCl$ в качестве псевдостационарной фазы (концентрации выше ККМ) могут реализоваться гидрофобные взаимодействия аналитов с внутренней полостью сформированной мицеллы и π - π -взаимодействия с имидазольным кольцом, что и приводит к более высоким факторам разрешения по сравнению с ЦТАБ.

Для выявления возможности одновременного определения поглощающих в УФ-области спектра аминокислот (DOPA ($\lambda_{max}=278$ нм), Tyr ($\lambda_{max}=278$ нм), Trp ($\lambda_{max}=279$ нм)) и непоглощающего глицина (Gly) выполнена серия экспериментов с $C_{12}MImCl$. При длине волны 220 нм (максимум поглощения имидазольной группы) наряду с сигналами поглощающих аналитов (*прямое детектирование*) регистрируется отрицательный пик,

соответствующий глицину (*косвенное детектирование*). При введении ионной жидкости $C_{12}MImCl$ в состав фонового электролита создавался поглощающий в УФ-области спектра фон, способствующий обнаружению аналитов без хромофорных групп (Рис. 33).

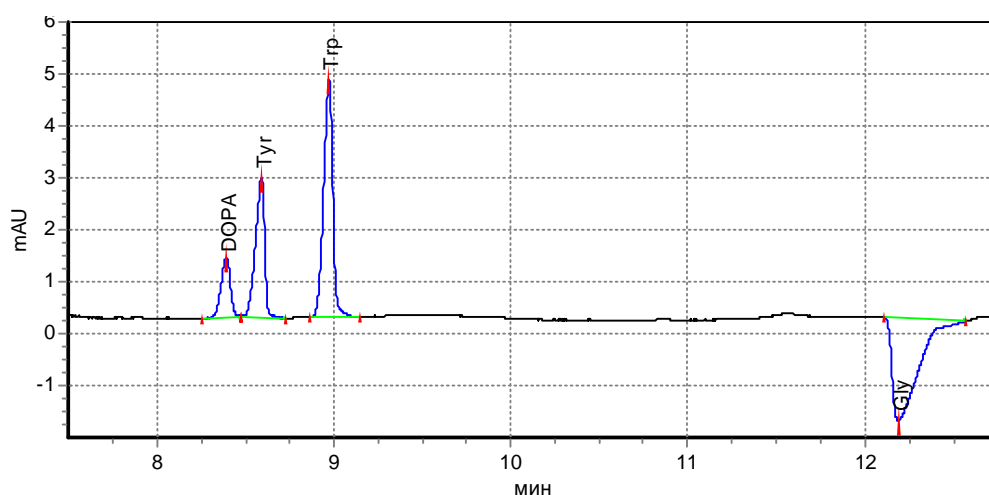


Рис. 33. Электрофореграмма смеси аминокислот. Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М». Фоновый электролит: 10 мМ раствор NaH_2PO_4 , $pH = 2.0$ (доведенный до требуемого значения 0.1 М раствором HCl), 6 мМ $C_{12}MImCl$. $U = -20$ кВ, ввод пробы: $5с \times 30$ мбар; λ : 220 нм.

Аналиты: Trp – триптофан, Tyr – тирозин, DOPA – 3,4-дигидроксифенилаланин, Gly – глицин.

В щелочной среде ($pH = 9.3$) аминокислоты заряжены отрицательно. Сонаправленное движение аналитов и ЭОП приводит к быстрой миграции аминокислот и уменьшению селективности разделения.

Выявлена возможность использования ионной жидкости $C_{16}MImCl$ в качестве псевдостационарной фазы при определении незаряженных гидрофобных аналитов - стероидных гормонов. Для их электрофоретического разделения в состав фонового электролита вводили $C_{16}MImCl$ в концентрациях, превышающих ККМ - режим мицеллярной электрокинетической

хроматографии. Установлено, что добавление ИЖ при концентрации выше ККМ не приводит к разделению всех стероидных гормонов из-за большого сродства к мицеллам.

Проведена серия экспериментов с участием β -циклодекстрина в фоновом электролите для увеличения селективности разделения кортикостероидов. Известно, что стероидные гормоны с β -циклодекстрином и его производными образуют комплексы включения за счет гидрофобных взаимодействий с гидрофобной полостью макроцикла (Рис. 34). В результате повышается гидрофильность аналита за счет образовавшегося ассоциата (внешняя поверхность ЦД – гидрофильна) и увеличивается миграционное окно, что способствует лучшему разделению аналитов.

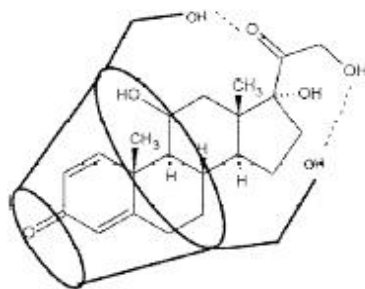


Рис. 34. Структура комплекса гормона с β -циклодекстрином [182].

После серии предварительных электрофоретических экспериментов по варьированию значений pH (2.0; 9.3) и концентрации фонового электролита (10-150 mM фосфатный или боратный буферные растворы), а также концентрации ионной жидкости $C_{16}MImCl$ (3-75 mM) и β -циклодекстрина (β -ЦД) (1-25 mM) найдены требуемые условия разделения кортикостероидов (Рис. 35).

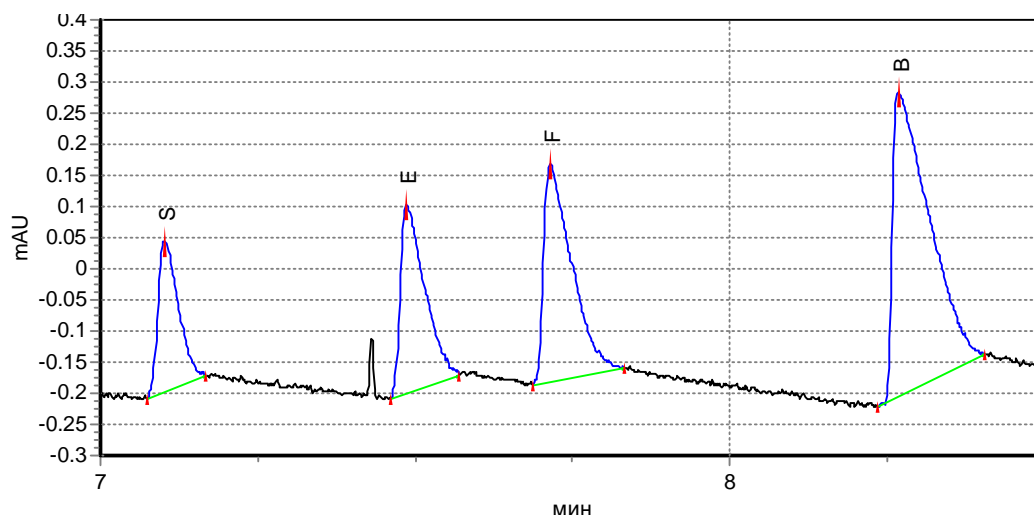


Рис. 35. Электрофореграмма стандартного раствора кортикостероидов с использованием в качестве псевдостационарной фазы $C_{16}MImCl$ в режиме МЭКХ.

Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М». Фоновый электролит: 75 мМ раствор NaH_2PO_4 , $pH = 2.0$ (доведенный до требуемого значения 0.1 М раствором HCl), 15 мМ $C_{16}MImCl$, 10 мМ β -ЦД, $\lambda = 240$ нм, $U = -20$ кВ, ввод пробы – 15 с \times 30 мбар. Аналиты: F-кортизол, E – кортизон, S – 11-дезоксикортизол, B – кортикостерон.

Таким образом, введение ИЖ $C_{12}MImCl$ и $C_{16}MImCl$ в состав фонового электролита в концентрации меньшей ККМ (зонный режим) приводит к увеличению эффективности для аминокислот и катехоламинов. А в режиме МЭКХ достигнуто разделение стероидных гормонов с участием в качестве псевдостационарной фазы $C_{16}MImCl$ и β -циклодекстрина.

ГЛАВА IV. КОВАЛЕНТНЫЕ ПОКРЫТИЯ СТЕНОК КВАРЦЕВОГО КАПИЛЛЯРА НА ОСНОВЕ ИОННЫХ ЖИДКОСТЕЙ

Несмотря на легкость создания динамических покрытий, одним из ограничений их использования является невысокая воспроизводимость параметров миграции, поэтому требуется постоянное возобновление таких покрытий. Другая проблема - снижение чувствительности за счет хромофорного фона, вызываемого имидазолиевыми катионами в составе фонового электролита. Поэтому в последнее время в ВЭЖХ отмечена тенденция к созданию иммобилизованных стационарных фаз на основе ИЖ [83], а в КЭ работ в этой области мало [97-100]. Главными достоинствами ковалентных покрытий на основе ИЖ являются стабильность и высокая воспроизводимость, генерация стабильного обращенного ЭОП. Основным результатом, как и в случае динамической модификации, является предотвращение сорбции основных аналитов, а возможность дополнительных взаимодействий аналитов с ИЖ обеспечивает увеличение селективности разделения. Еще одно преимущество – возможность применения масс-спектрометрического детектирования при проведении разделения на обращенной полярности (ЭОП направлен к аноду).

Нами предложен способ создания ковалентных покрытий на основе имидазолиевых ионных жидкостей, включающий травление капилляра щелочью, стадию силилирования с последующей функционализацией имидазолом и 1-бромбутаном (Рис. 36).

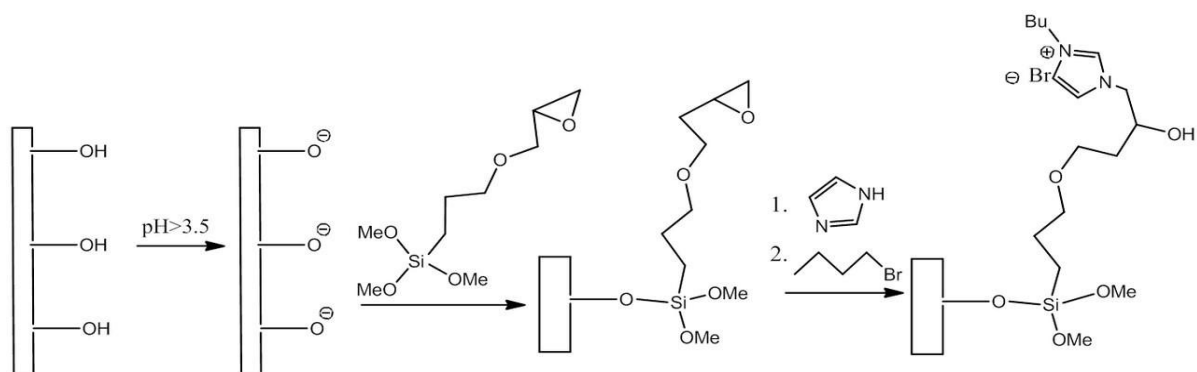


Рис. 36. Схема создания ковалентных покрытий на основе имидазольевых ИЖ.

Степень модификации контролировалась по направлению и скорости ЭОП (Рис. 37а). Синтезированные покрытия создавали сильный анодный ЭОП при $\text{pH} = 2.0$ ($\text{RSD}=2.3\%$, $n=10$, $p=0.95$).

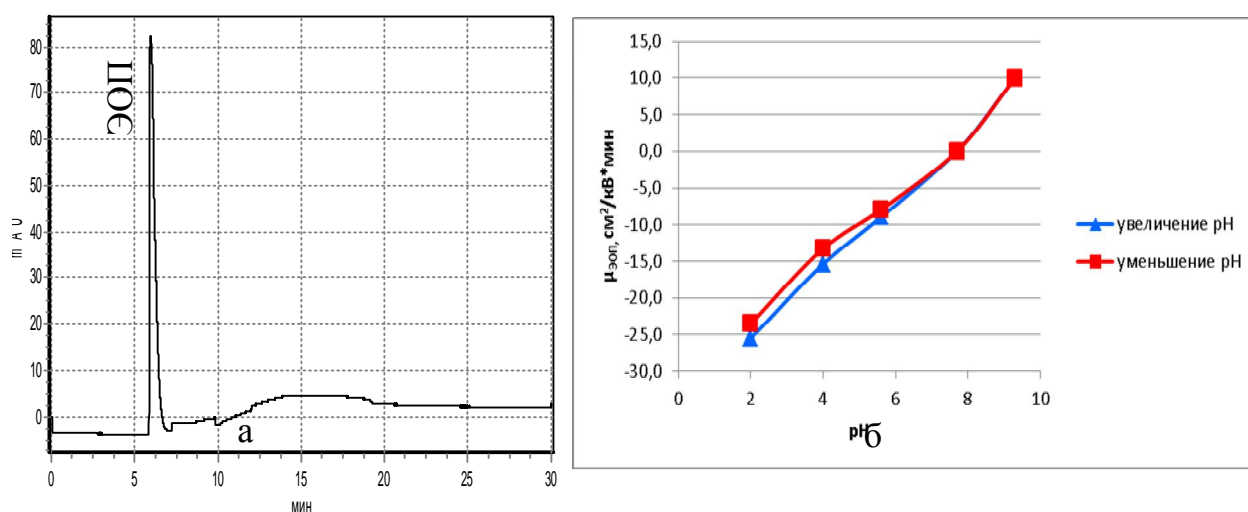


Рис. 37. (а) Электрофореграмма маркера ЭОП ($\text{pH} = 2.0$). (б) Зависимость скорости ЭОП от pH фонового электролита.

Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М». Фоновый электролит: 10 мМ раствор NaH_2PO_4 (доведенный до требуемого значения pH 0.1 М раствором HCl) или 10 мМ раствор H_3BO_3 (доведенный до требуемого значения pH 0.1 М раствором NaOH). Условия: Напряжение ± 20 кВ, детектирование – 220 нм. Маркер ЭОПа – 5 %-ный (объемн.) раствор ДМФА в воде.

На модифицированном капилляре исследована зависимость скорости и направления ЭОП от pH фонового электролита (Рис. 37б). Установлено, что при увеличении pH рабочего буфера происходит ослабление ЭОП, а при pH 9.3 генерируется катодный ЭОП, что указывает на наличие остаточных силанольных групп на поверхности кварцевого капилляра. После работы в щелочной среде и при возвращении к $\text{pH} = 2.0$ анодный ЭОП вновь восстанавливался, однако использование капилляров при высоких pH нежелательно, потому что срок их службы резко снижается (150 анализов в кислой среде, 10 - в щелочной). Таким образом, ковалентные покрытия оказались устойчивыми при значениях pH фонового электролита 2.0-5.5.

Наличие ковалентного покрытия независимо подтверждено и методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (Рис. 38).

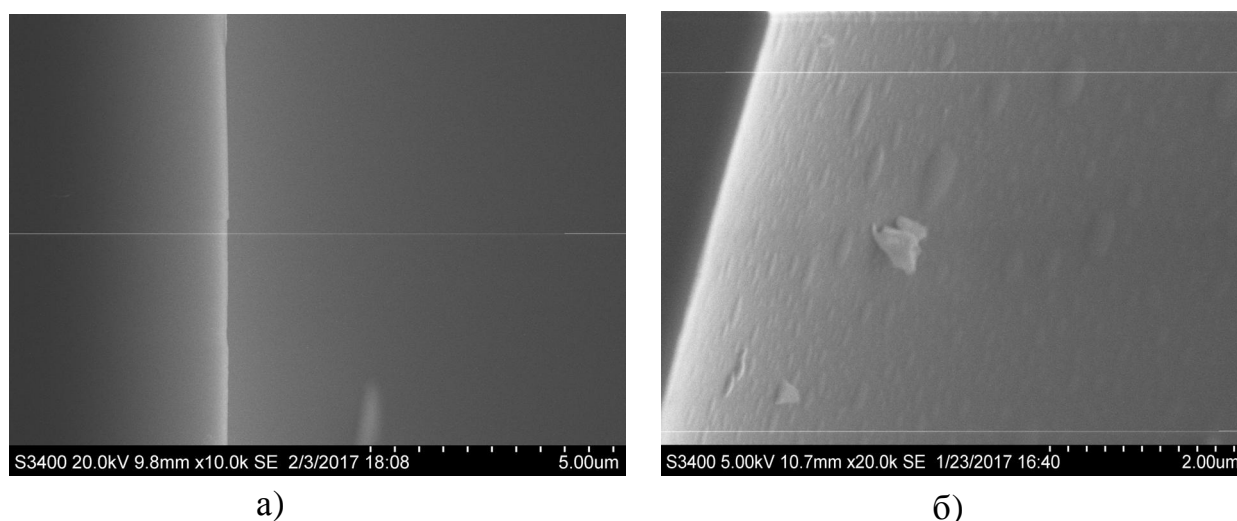


Рис. 38. Фотографии поверхности кварцевого капилляра, полученные методом СЭМ: (а) поверхность кварцевого капилляра, (б) поверхность кварцевого капилляра, иммобилизованная ионной жидкостью. Прибор: HITACHI S-3400N, Условия съемки: изображение во вторичных электронах (SE), ускоряющее напряжение 10 кВ (а) и 20 кВ (б), масштаб: 5 мкм (а) и 2 мкм (б), экспозиция 320 секунд на изображение.

Появление сигнала брома в спектрах ковалентных покрытий, полученных методом энергодисперсионного микроанализа (EDX), также свидетельствует об иммобилизации ионной жидкости на поверхности кварцевого капилляра (Рис. 39).

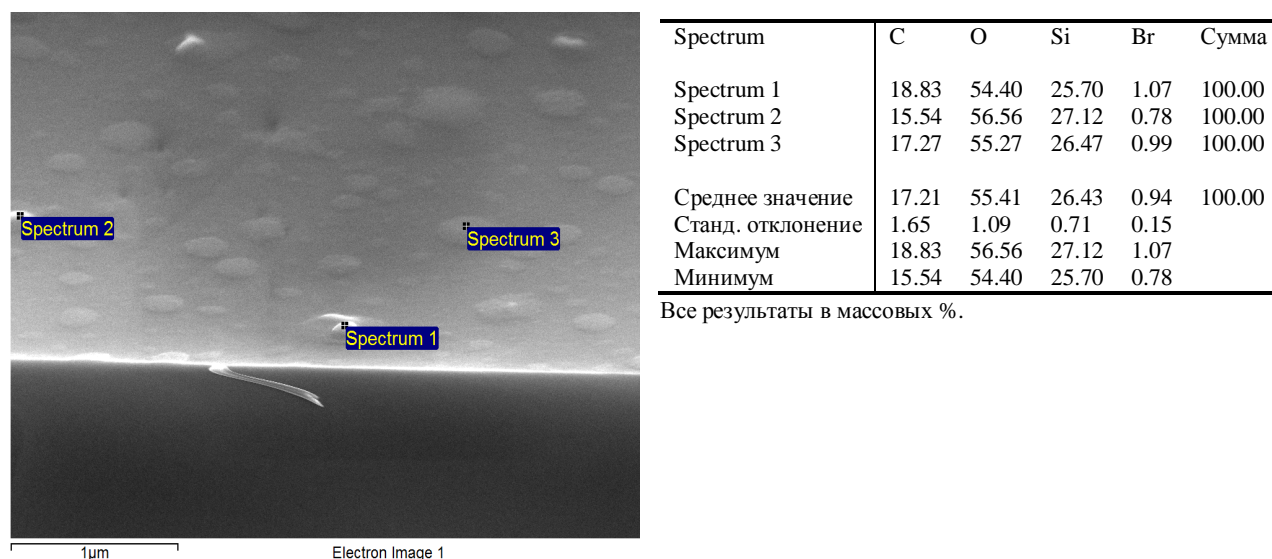


Рис. 39. Результаты энергодисперсионного микроанализа поверхности кварцевого капилляра, модифицированного ионной жидкостью. Прибор: HITACHI S-3400N, Условия съемки: изображение во вторичных электронах (SE), ускоряющее напряжение 20 кВ, масштаб 1 мкм, экспозиция 320 секунд на изображение.

Для оценки аналитических возможностей ковалентных покрытий на основе ИЖ в качестве модельных систем выбраны основные соединения: биогенные амины и аминокислоты.

При разделении аналитов с использованием капилляров с ковалентно пришитой ионной жидкостью эффективность возросла в 2-5 раз и достигала значений до 300 тыс т.т. (Рис. 40), что указывало на возможность применения и

различных вариантов внутрикапиллярного концентрирования для снижения пределов обнаружения.

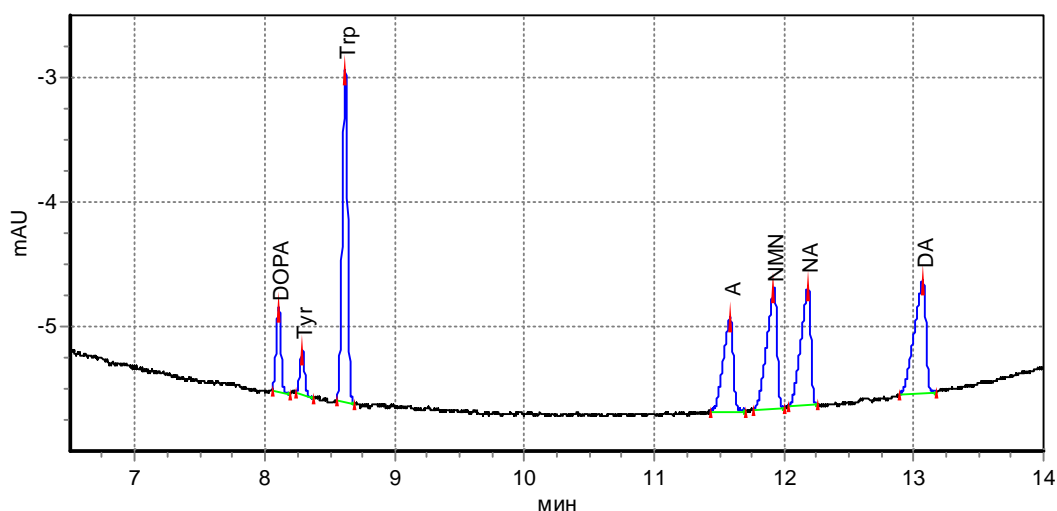


Рис. 40. Электрофореграммы модельной смеси биогенных аминов и аминокислот. Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М», кварцевый капилляр с ковалентным покрытием на основе ИЖ. Фоновый электролит: 10 mM раствор NaH_2PO_4 (доведенный до требуемого значения pH 0.1 M раствором HCl). Детектирование – 220 нм. Напряжение: -20 кВ. Аналиты: NA – норадреналин, А – адреналин, NMN – норметанефрин, DA – дофамин, Tyr – тирозин, Trp – триптофан, DOPA – 3,4-дигидроксифенилаланин.

На синтезированных покрытиях аналиты и ЭОП мигрируют в противоположных направлениях, что способствует концентрированию. Однако полученные значения пределов обнаружения (120-620 нг/мл) оказались недостаточными для определения биогенных аминов и аминокислот в биологических жидкостях. Для снижения пределов обнаружения изучены возможности различных вариантов *on-line* концентрирования (стэкинг с большим объемом вводимой пробы и с «водной пробкой»).

Факторы концентрирования (SEF_h) определяли по формуле

$$SEF_h = \frac{h_1}{h_2} \cdot r \quad (6)$$

h_1 – высота пика соответствующего аналита при концентрировании;

h_2 – высота пика при стандартных условиях (2с 30 мбар – стэкинг с усилением поля, 2 с 10 кВ - электростэкинг)

r – коэффициент разбавления.

Для выбора требуемых условий варьировали время ввода анализируемой пробы (2-100 с), время ввода «водной пробки» (0-30 с) и давление ввода пробы (30-50 мбар). Факторы концентрирования (SEF_h) и пределы обнаружения (ПО) составили 58-135 и 11-95 нг/мл, соответственно (табл. 16).

Таблица 16. Результаты *on-line* концентрирования биогенных аминов и аминокислот на синтезированных N-бутилимидазолиевых покрытиях.

	На модифицированном капилляре											
	Без концентрирования				Стэкинг с большим объемом вводимой пробы				Стэкинг с «водной пробкой»			
Аналит	A	NMN	NA	DA	A	NMN	NA	DA	A	NMN	NA	DA
Фоновый электролит	10 мМ Na ₂ HPO ₄ , pH = 2.0 (доведенный 0.1 М HCl)											
Ввод пробы	60 мбар*с				1500 мбар*с				Вода: 150 мбар*с Проба: 1500 мбар*с			
SEF _h	4	5	4	4	125	120	135	105	125	120	135	100
ПО, нг/мл	520	350	370	320	17	14	11	12	17	14	11	12
Аналит	DOPA		Tyr		Trp		DOPA		Tyr		Trp	
Фоновый электролит	10 мМ Na ₂ HPO ₄ , pH = 2.0 (доведенный 0.1 М HCl)											
Ввод пробы	60 мбар*с				1500 мбар*с				Вода: 150 мбар*с Проба: 1500 мбар*с			
SEF _h	5	7	8		61	58	85		65	58	86	
ПО, нг/мл	620	770		120	51	95	11		48	95	11	

Синтезированные покрытия испытаны и при концентрировании аналитов в условиях свипинга. В качестве мицеллообразующего агента применяли ДДСН в концентрации 10-50 мМ. Молекулы детергента за счет гидрофобных

взаимодействий модифицируют стенки капилляра, образуя двойной слой (Рис. 41а). В результате поверхность приобретает отрицательный заряд и создается сильный катодный ЭОП ($t_{\text{ЭОП}} = 3.9 - 4.0$ мин). При этом аналиты мигрируют после ЭОП (Рис. 41б), что указывает на их взаимодействие с мицеллами ДДСН.

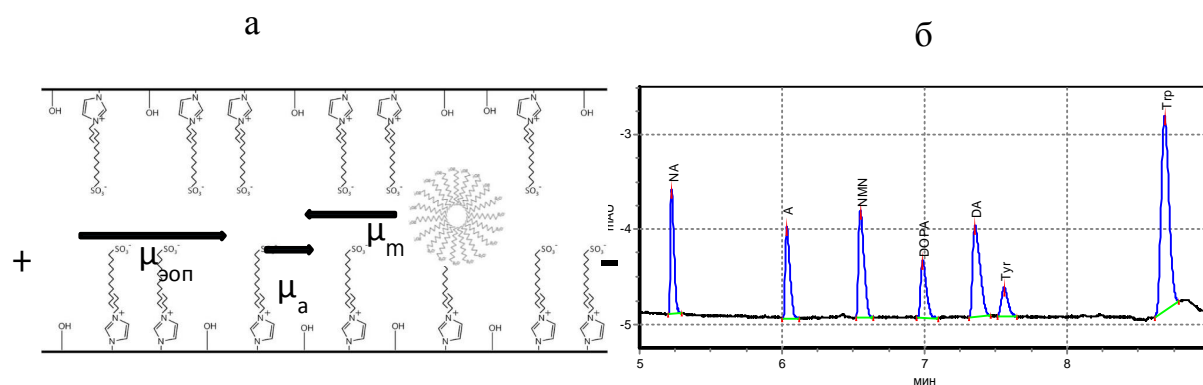


Рис. 41. Схема механизма разделения биогенных аминов в кварцевых капиллярах с ковалентно пришитой ИЖ в условиях МЭКХ (а). Электрофореграмма модельной смеси аналитов (б). Условия: Капель 105 М, фоновый электролит: 10 мМ NaH_2PO_4 , $\text{pH} = 2.0$ (доведенный 0.1 М HCl), 25 мМ ДДСН. Напряжение 20 кВ, ввод пробы 5 с 30 мбар, детектирование – 220 нм. Аналиты: NA – норадреналин, А – адреналин, NMN – норметанефрин, DA – дофамин, Тург - тирозин, Тгр – триптофан, DOPA – 3,4-дигидроксифенилаланин. $\mu_{\text{ЭОП}}$ – электрофоретическая подвижность ЭОПа, μ_a – электрофоретическая подвижность аналитов, μ_m – электрофоретическая подвижность мицелл ДДСН.

В данной системе могут реализоваться не только гидрофобные взаимодействия аналитов с полостью мицеллы, но и электростатические: молекулы ДДСН, адсорбированные на поверхности ковалентно модифицированного кварцевого капилляра, могут выступать и в качестве сильного катионообменника, что создает дополнительный резерв в увеличении селективности разделения.

Сонаправленное движение аналитов и ЭОП позволяет реализовать *on-line* концентрирование биогенных аминов в условиях электростэкинга. В таком

варианте значения факторов концентрирования для биогенных аминов превысили 1000, а пределы обнаружения удалось снизить до 1-2 нг/мл (Табл. 17).

Таблица 17. Результаты *on-line* концентрирования биогенных аминов и аминокислот на синтезированных N-бутилимидазолиевых покрытиях в условиях свипинга

Метод концентрирования	Свипинг с большим объемом вводимой пробы				Свипинг+электростэкинг			
Аналиты	A	NMN	NA	DA	A	NMN	NA	DA
Фоновый электролит	10 mM NaH ₂ PO ₄ , pH = 2.0 (доведенный 0.1 M HCl), 50 mM ДДСН							
Ввод пробы	50 мбар 50 с				15 кВ 50 с			
SEF _h	130	160	150	140	1500	930	1460	1030
ПО, нг/мл	17	11	10	9	1	2	1	2
Аналиты	DOPA	Tyr	Trp		DOPA	Tyr	Trp	
Фоновый электролит	10 mM NaH ₂ PO ₄ , pH = 2.0 (доведенный 0.1 M HCl), 50 mM ДДСН							
Ввод пробы	50 мбар 50 с				15 кВ 10 с			
SEF _h	110	130	180		30	25	30	
ПО, нг/мл	30	40	5		120	210	35	

Таким образом, предложен вариант создания ковалентных покрытий на основе ИЖ, выявлены возможности различных вариантов *on-line* концентрирования (*стэкинг с большим объемом вводимой пробы и «водной пробкой»*, *свипинг с большим объемом вводимой пробы*, *свипинг в сочетании с электростэкингом*) основных аналитов. Лучшие результаты достигнуты в случае биогенных аминов в условиях свипинга в сочетании с электростэкингом (SEF_h = 930-1500), а для аминокислот – в условиях свипинга с большим объемом вводимой пробы (SEF_h = 110-180).

ГЛАВА V. ИОННЫЕ ЖИДКОСТИ – ХИРАЛЬНЫЕ СЕЛЕКТОРЫ

Другая возможная и важная функция ИЖ с хиральным катионом или анионом – разделение энантиомеров. Среди хиральных имидазолиевых ионных

жидкостей наибольшее распространение получили аминокислотные, благодаря незначительному поглощению в УФ-области, стабильности, высокой биосовместимости и легкости синтеза по сравнению с другими хиральными ИЖ. Аминокислотные ионные жидкости с анионами L-Pro и L-Orn уже были испытаны в качестве хиральных селекторов при разделении энантиомеров аминокислот в условиях лигандообменного капиллярного электрофореза (ЛОКЭ) [129, 132].

Ионные жидкости ряда $[C_nMIm][L-Pro]$ ($n=2, 4, 6, 8$) применяли в качестве хиральных лигандов, координированных с ионами Cu (II), при разделении энантимеров фенилаланина, гистидина, триптофана и тирозина [129]. Показано, что при увеличении длины алкильного радикала в ИЖ увеличивается селективность разделения аминокислот в условиях ЛОКЭ. При варьировании pH фонового электролита большая селективность разделения достигнута при значении pH 4.0 (Рис. 42).

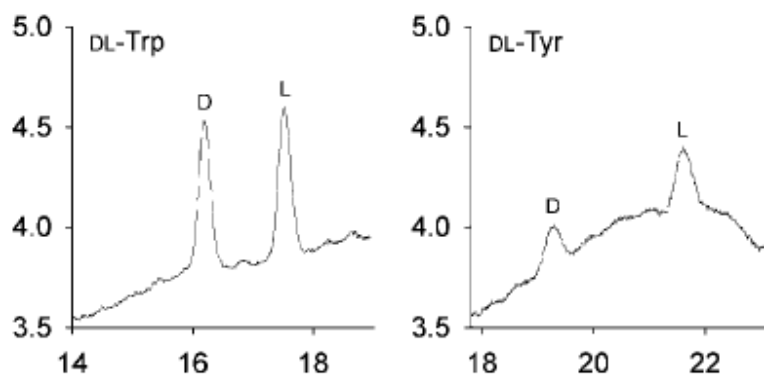


Рис. 42. Электрофореграмма смеси энантиомеров триптофана и тирозина.. Условия: фоновый электролит: 30 mM $[C_6MIm][L-Pro]$, 15 mM $Cu(As)_2$ и MeOH (30%, объемн.) в воде (pH = 4.0). Напряжение: +30 кВ, $\lambda=200$ нм [129].

Разделение энантимеров аминокислот при $\text{pH} = 4.0$, на наш взгляд, - весьма интересный результат, поскольку изоэлектрическая точка L-Pro 6.3, и при pH ниже этого значения L-Pro заряжен положительно, что, казалось бы, должно было затруднять образование устойчивого комплекса с солями меди (II). Нами высказано предположение, что высокая селективность разделения энантимеров аминокислот может быть достигнута при pH фоновой электролита > 6.3 . Это предстояло проверить.

С этой целью была синтезирована аминокислотная ионная жидкость 1-бутил-3-метилимидазолий L-пролинат ($[\text{C}_4\text{MIm}][\text{L-Pro}]$) (Рис. 43) [176].

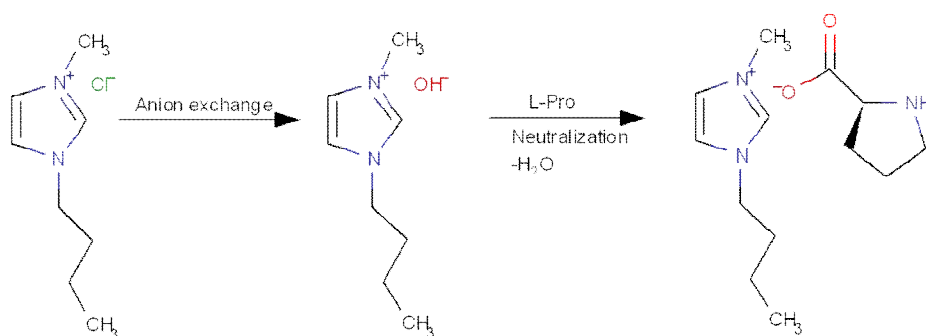


Рис. 43. Схема синтеза аминокислотной ионной жидкости $[\text{C}_4\text{MIm}][\text{L-Pro}]$ [176].

V.1. Разделение энантимеров аминокислот в условиях лигандообменного капиллярного электрофореза с хиральной ионной жидкостью $[\text{C}_4\text{MIm}][\text{L-Pro}]$ в фоновом электролите

Установлено, что разделение аминокислот методом КЗЭ характеризуется низкой эффективностью. Синтезированная ионная жидкость, введенная в фоновый электролит ($\text{pH} = 12.2$), за счет положительно заряженной имидазольной группы динамически модифицирует отрицательно заряженные стенки кварцевого капилляра, ослабляя ЭОП и предотвращая адсорбцию

аналитов, что сказывается на увеличении эффективности в 2 раза и времен миграции триптофана и тирозина. Введение солей меди (II) приводило к образованию хелатного комплекса между ИЖ, металлом и энантиомерами аминокислот (Рис. 44), обеспечивая разделение последних [183].

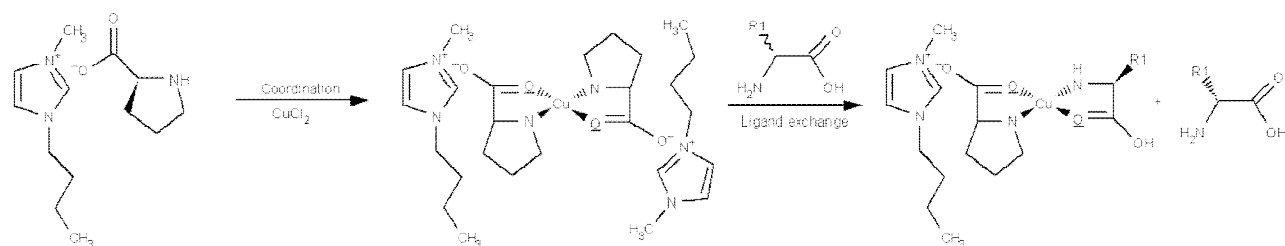


Рис. 44. Схема разделения энантиомеров аминокислот с участием [C₄MIm][L-Pro] в условиях ЛОКЭ.

Появление полосы поглощения в в УФ-спектрах в диапазоне 240-260 нм подтверждает факт образования комплекса (Рис. 45).

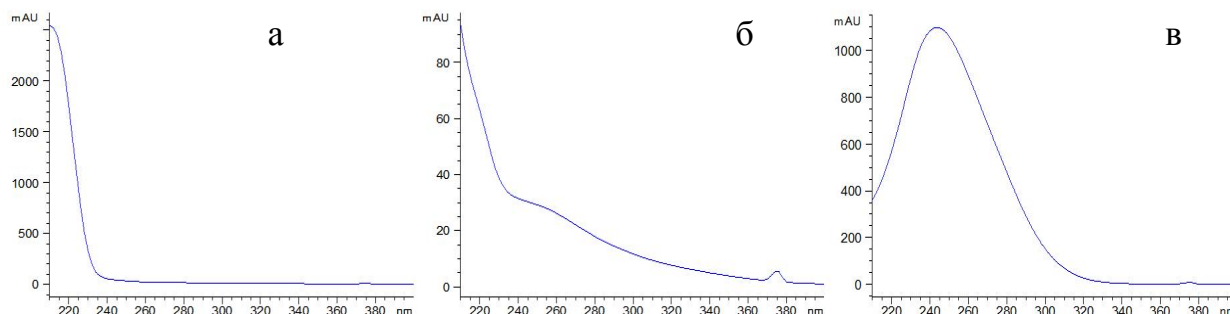


Рис. 45. УФ-спектры компонентов фонового электролита.

Условия: система капиллярного электрофореза «СЕ - 7100» с диодно-матричным детектором, дейтериевая лампа, диапазон измерения 190-400 нм с шагом 2 нм. (а) [C₄MIm][L-Pro], (б) CuCl₂, (в) [C₄MIm][L-Pro] + CuCl₂.

Селективность разделения энантиомеров, в первую очередь, определяется различием устойчивости комплексов «*L*-аминокислота – Cu (II) – [C₄MIm][L-Pro]» и «*D*-аминокислота – Cu (II) – [C₄MIm][L-Pro]». Устойчивость комплекса с *L*-аминокислотой выше, поскольку нет стерического отталкивания между радикалами *L*-энантиомера и *L*-пролината в составе ионной жидкости (Рис. 46).

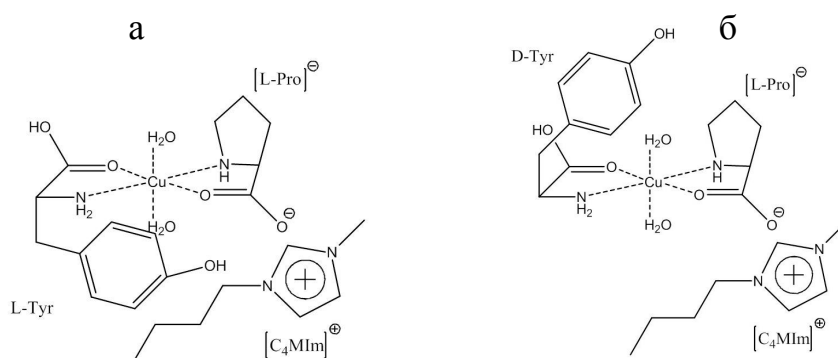


Рис. 46. Предполагаемые структуры комплексов *L*-Tyr – Cu (II) – [C₄MIm][L-Pro] (а) и *D*-Tyr – Cu (II) – [C₄MIm][L-Pro] (б).

Изучено влияние различных факторов на разрешение энантиомеров аминокислот: рН фонового электролита, мольное соотношение металл-лиганд, концентрация хелатного комплекса, природа металла-комплексобразователя (Cu (II), Zn (II)) [183].

Выявлена зависимость факторов разрешения энантиомеров аминокислот от рН фонового электролита (7.0-13.0) в условиях лигандообменного капиллярного электрофореза (Рис. 47).

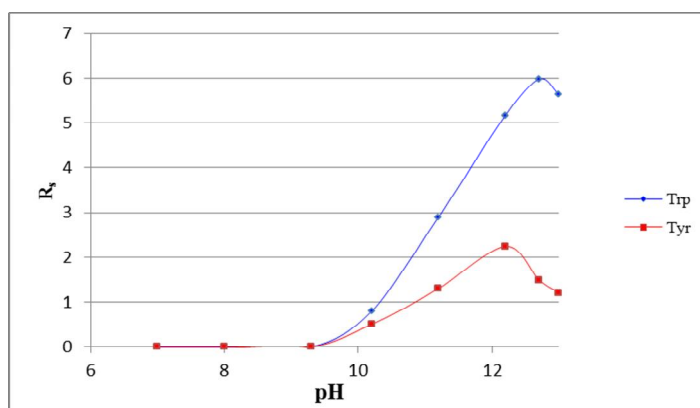


Рис. 47. Зависимость факторов разрешения энантиомеров аминокислот от pH фонового электролита в условиях ЛОКЭ. Условия: система капиллярного электрофореза «СЕ -7100», фоновый электролит: 20 mM $[C_4MIm][L-Pro]$, 10 mM $CuCl_2$, 50 mM H_3BO_3 (доведенный до требуемого значения pH 0.5 M раствором NaOH), напряжение: +15 кВ, $\lambda=210$ нм.

Из представленной графической зависимости видно, что с ростом pH фонового электролита факторы разрешения энантиомеров аминокислот увеличиваются, но при достижении значения pH = 12.2 для энантиомеров тирозина и 12.7 – для триптофана начинают снижаться. При увеличении pH фонового электролита растет эффективный заряд аминокислот, что благоприятствует образованию хелатного комплекса. Однако при высоких значениях pH преобладают процессы гидролиза солей меди, что и приводит к снижению селективности разделения энантиомеров. Поэтому фоновый электролит с pH = 12.2 выбран для дальнейших экспериментов.

Изучена зависимость факторов разрешения энантиомеров аминокислот от мольного соотношения $[C_4MIm][L-Pro] : Cu(II)$ в фоновом электролите (Рис. 48).

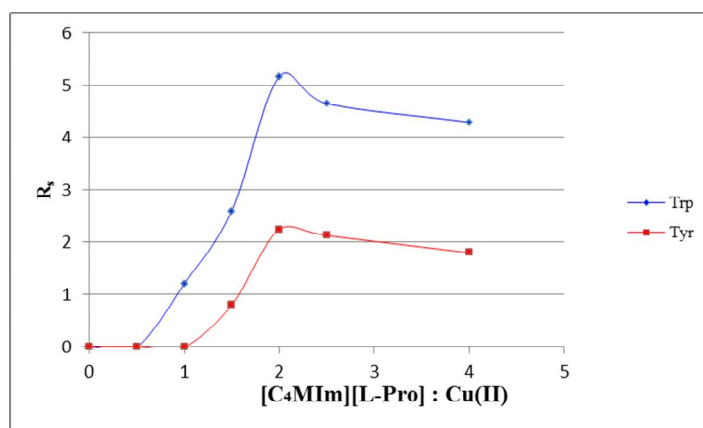


Рис. 48. Зависимость факторов разрешения энантиомеров аминокислот от мольного соотношения $[C_4MIm][L-Pro]:Cu(II)$. Условия: система капиллярного электрофореза «СЕ -7100», фоновый электролит: 50 мМ боратный буфер (pH = 12.2), 10 мМ $CuCl_2$, $[C_4MIm][L-Pro]$, напряжение: +15 кВ, $\lambda=210$ нм.

Установлено, что наибольшие факторы разрешения наблюдаются в том случае, когда соотношение металл-лиганд составляет 1:2 (мольн.), что согласуется с результатами, полученными в [129]. Дело в том, что в водных растворах ионы меди (II) образуют аквакомплексы состава $[Cu(H_2O)_6]^{2+}$ (координационное число 6). Аминокислоты в составе ИЖ могут выступать в качестве бидентантных лигандов, образуя плоские квадратные комплексы с ионами Cu^{2+} в соотношении металл-лиганд – 1:2 (мольн.) состава $[Cu([C_4MIm][L-Pro])_2(H_2O)_2]^{2+}$. Вытеснение еще двух молекул воды из внутренней сферы образованного комплекса затрудняется отталкиванием радикалов лигандов.

Концентрация комплекса в фоновом электролите тоже существенным образом влияет на селективность разделения энантиомеров аминокислот. Выявлена зависимость факторов разрешения от концентрации $[C_4MIm][L-Pro]$ в

фоновом электролите в диапазоне 5-30 мМ при постоянном соотношении металл-лиганд (1:2, мольн.) (Рис. 49).

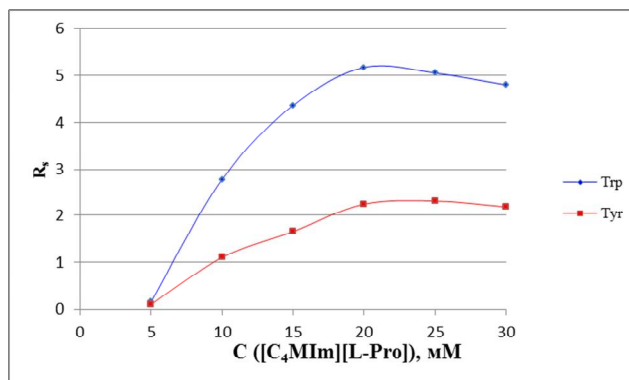


Рис. 49. Зависимость факторов разрешения энантиомеров аминокислот от концентрации ионной жидкости $[C_4MIm][L-Pro]$ в составе фонового электролита. Условия: система капиллярного электрофореза «СЕ - 7100», фоновый электролит: 50 мМ боратный буфер (pH = 12.2), соотношение $[C_4MIm][L-Pro]$ - Cu(II), 2:1 (мольн.), напряжение: +15 кВ, $\lambda=210$ нм.

Показано, что при увеличении концентрации ИЖ в составе фонового электролита увеличиваются факторы разрешения энантиомеров аминокислот и при достижении концентрации 20 мМ практически не изменяются.

Согласно теории жестких и мягких кислот и оснований Пирсона, наиболее подходящими металлами - комплексообразователями для лиганда $[C_4MIm][L-Pro]$ являются кислоты средней жесткости (Cu^{2+} , Zn^{2+} и Fe^{2+}). Сопоставлены результаты, полученные при использовании в качестве центрального иона Cu^{2+} и Zn^{2+} . Показано, что в случае ионов Cu (II) достигаются более высокие значения селективности разделения по сравнению с ионами Zn (II) (табл. 18).

Таблица 18. Параметры разделения энантиомеров аминокислот в зависимости от природы металла-комплексобразователя ($n=3$, $p=0.95$).

	t_R , мин		N, т.т.		α		R_s	
	ZnSO ₄	CuCl ₂	ZnSO ₄	CuCl ₂	ZnSO ₄	CuCl ₂	ZnSO ₄	CuCl ₂
L-Trp	10.2±0.2	10.0±0.2	32500±600	114000±1000	1.08±0.06	1.25±0.07	1.6±0.2	5.2±0.3
D-Trp	10.6±0.2	10.7±0.2	42100±700	111000±1000				
L-Tyr	16.8±0.3	17.2±0.3	19400±400	58100±800	1.07±0.06	1.17±0.07	1.3±0.1	2.2±0.2
D-Tyr	17.5±0.4	18.0±0.4	14700±300	32200±600				

Таким образом, лучшие условия разделения энантиомеров триптофана и тирозина следующие: 50 мМ боратный буфер ($pH = 12.2$), 20 мМ [C₄MIm][L-Pro], 10 мМ CuSO₄ (Рис. 50).

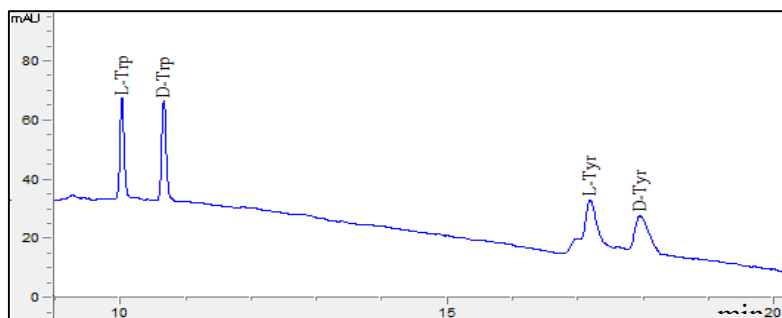


Рис. 50. Электрофореграмма рацемических смесей триптофана и тирозина в оптимизированных условиях. Условия: система капиллярного электрофореза «CE-7100», фоновый электролит: 50 мМ боратный буфер ($pH = 12.2$), 20 мМ [C₄MIm][L-Pro], 10 мМ CuCl₂, напряжение: +15 кВ, $\lambda=210$ нм.

Для объяснения полученных результаты была запланирована и проведена серия специальных экспериментов, в которых

- в фоновый электролит в качестве хирального селектора вводили L-Pro (20 мМ);

- фоновый электролит вводили смешанную систему: хиральный селектор *L*-Pro (20 мМ) и ахиральную ионную жидкость 1-бутил-3-метилимидазолий хлорид (C_4MImCl) (20 мМ) (Рис. 51).

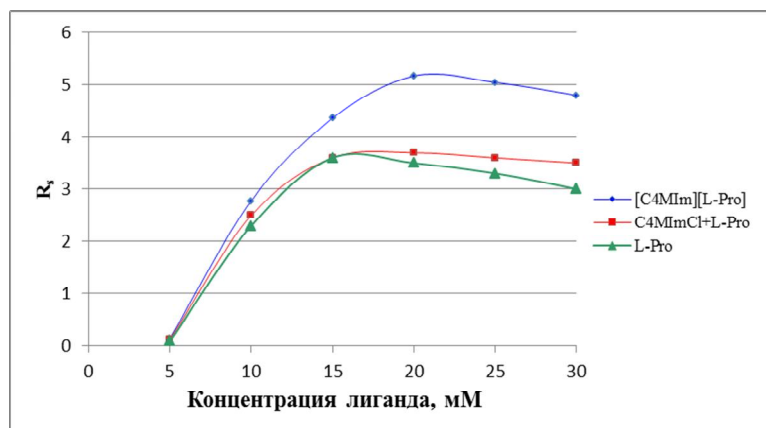


Рис. 51. Зависимость факторов разрешения энантиомеров триптофана от природы и концентрации лиганда. Условия: система капиллярного электрофореза «СЕ -7100», фоновый электролит: 50 мМ боратный буфер (pH = 12.2), хиральный селектор, 10 мМ $CuCl_2$, напряжение: +15 кВ (для $[L-Pro]$ +30 кВ), $\lambda=210$ нм.

Факторы разрешения (R_s) энантиомеров аминокислот при наличии бинарной добавки в фоновом электролите оказались выше, чем в присутствии только *L*-Pro, однако ниже, чем были достигнуты с применением $[C_4MIm][L-Pro]$ (Рис. 51).

Аминокислотная ионная жидкость выступает не только в качестве хирального селектора, но и создает динамическое покрытие, а дополнительное образование ассоциатов энантиомеров аминокислот с ионной жидкостью на поверхности кварцевого капилляра обеспечивает высокие значения факторов разрешения. Стабильность комплекса $[C_4MIm][L-Pro] - Cu(II)$ также имеет важное значение при разделении энантиомеров. Полученные результаты

свидетельствуют, что замена одной молекулы $[C_4MIm][L-Pro]$ в комплексе протекает легче, чем замена L-Pro, поэтому и факторы разрешения в случае $[C_4MIm][L-Pro]$ выше (Рис 51).

Для изучения влияния длины алкильного радикала в составе молекулы ИЖ на разделение энантиомеров аминокислот был синтезирован ряд аминокислотных ионных жидкостей $[C_nMIm][L-Pro]$ (где $n = 2, 8, 12$). С ростом длины алкильного радикала в составе ИЖ устойчивость комплексов $[C_nMIm][L-Pro] - Cu(II) - [C_nMIm][L-Pro]$ уменьшается, что облегчает вытеснение одной молекулы ИЖ энантиомером аминокислоты. Октильная и додецильная группы в ИЖ препятствуют образованию диастереомерных комплексов, что приводит к резкому снижению факторов разрешения. В случае $[C_{12}MIm][L-Pro]$ наблюдается к тому же и изменение направления ЭОП, в результате разделение энантиомеров не происходит (Рис. 52).

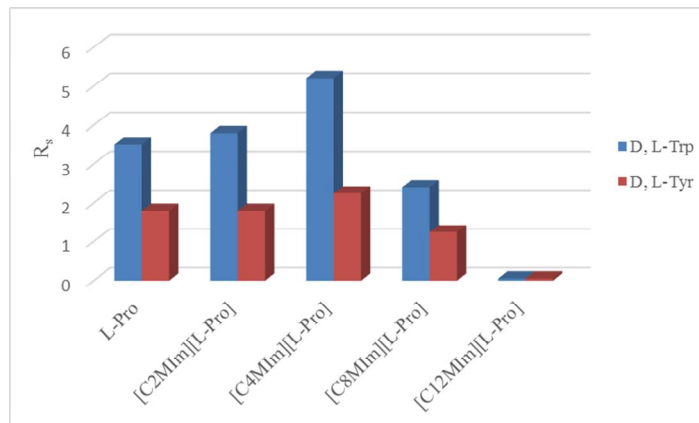


Рис. 52. Зависимость факторов разрешения энантиомеров триптофана и тирозина от природы хирального лиганда. Условия: система капиллярного электрофореза «CE -7100», фоновый электролит: 50 мМ боратный буфер (pH = 12.2), хиральный селектор, 10 мМ $CuCl_2$, напряжение: +15 кВ (для [L-Pro] и $[C_2MIm][L-Pro]$ +30кВ), $\lambda=210$ нм.

Результаты для $[C_4MIm][L-Pro]$ сопоставлены с соответствующими данными для синтезированной аминокислотной ионной жидкости, содержащей такой же катион, но другой анион - 3-бутил-1-метилимидазолий L-глутамат $[C_4MIm][L-Glu]$. При pH фонового электролита 12.2, разделение энантиомеров аминокислот в присутствии $[C_4MIm][L-Glu]$ не происходит. При pH фонового электролита 7.0 достигнуто разделение энантиомеров тирозина ($R_s=1.61\pm0.04$); снижение pH уже до 5.5 нивелирует достигнутое разделение энантиомеров этой аминокислоты, но при этом достигается положительный результат для стереоизомеров триптофана ($R_s=0.86\pm0.05$) (Рис. 53).

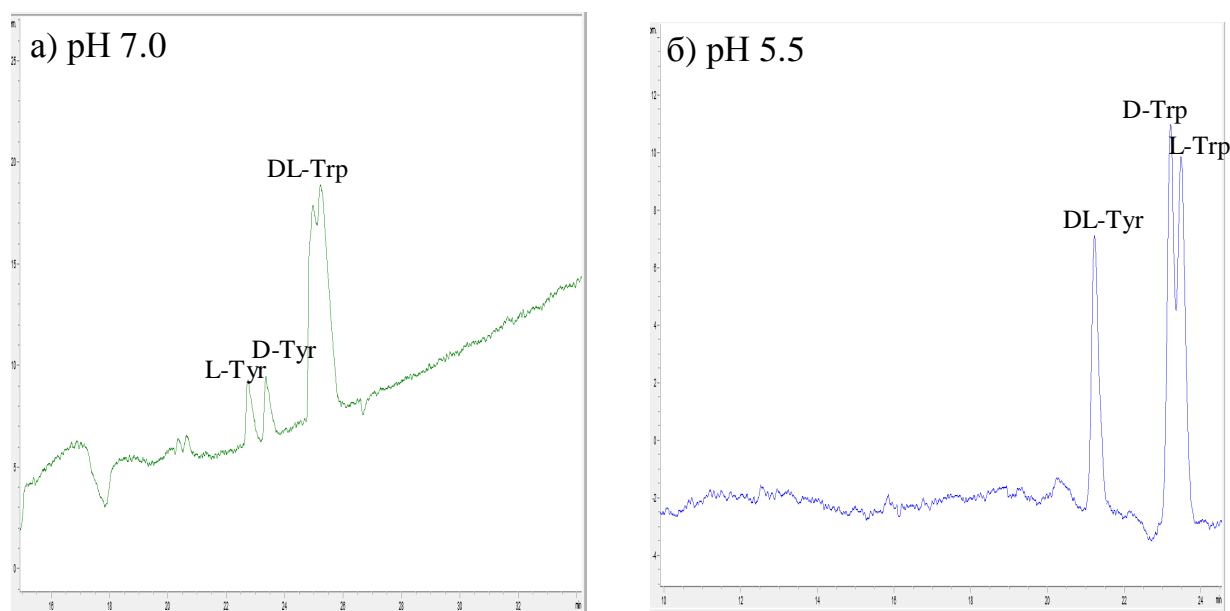


Рис. 53. Электрофореграммы рацемической смеси триптофана и тирозина в условиях ЛОКЭ с участием $[C_4MIm][L-Glu]$. Условия: «CE -7100», фоновый электролит: 50 мМ фосфатный буфер, 20 мМ $[C_4MIm][L-Glu]$, 10 мМ $CuCl_2$, напряжение: +15 кВ, $\lambda=210$ нм. (а) pH = 7.0, (б) pH = 5.5.

Каковы возможные объяснения?

При рН фонового электролита 12.2 комплекс между медью и *L*-глутаминовой кислотой существует в виде $[\text{Cu}(\text{L-Glu})_2]^{2-}$ [184], в результате между одноименно заряженными аналитами и комплексом имеют место электростатические отталкивания; в диапазоне рН от 5 до 7 соответствующий комплекс нейтрален $[\text{Cu}(\text{L-Glu})_2]^0$; в этих условиях и достигается частичное разделение энантиомеров аминокислот.

Высокие значения факторов разрешения энантиомеров аминокислот в случае $[\text{C}_4\text{MIm}][\text{L-Pro}]$ по сравнению с $[\text{C}_4\text{MIm}][\text{L-Glu}]$ можно объяснить образованием жесткого пятичленного цикла (правило Чугаева) между ионами меди (II) и хиральной аминокислотной ионной жидкостью $[\text{C}_4\text{MIm}][\text{L-Pro}]$, характеризующегося более высокой константой устойчивости (по аналогии с *L-Pro* и *L-Glu*).

Таким образом, хиральное разделение стереоизомеров аминокислот в условиях лигандообменного капиллярного электрофореза с участием аминокислотных ионных жидкостей, в первую очередь, зависит от природы аниона, рН фонового электролита и заместителей в имидазольном катионе.

V.2. Электрофоретическое разделение энантиомеров β -адреноблокаторов при совместном введении в фоновый электролит хиральной ионной жидкости $[\text{C}_4\text{MIm}][\text{L-Pro}]$ и (2-гидроксипропил- β -циклодекстрина)

Известно, что энантиомеры β -адреноблокаторов могут быть разделены с использованием различных хиральных лигандов в условиях ЛОКЭ. Например, в [185] разделяли восемь аминоспиртов с использованием *HO-L-Нур* в качестве хирального селектора. Установлено, что образование комплекса *HO-L-Нур* - *Си* (II) - аналит происходит при высоком значении рН. Поэтому нами

первоначально были испытаны условия лигандообменного капиллярного электрофореза с участием $[C_4MIm][L-Pro]$ в качестве хирального селектора при $pH = 12.2$ для разделения энантиомеров карведилола и пропранолола. Разделение данных энантиомеров в этих условиях не наблюдалось.

Другим подходом явилось использование смешанных хиральных селекторов, в качестве которых был выбран β -циклодекстрин и его гидроксипропилпроизводное [183]. Установлено, что добавление $[C_4MIm][L-Pro]$ в состав фонового электролита, содержащего ГП- β -ЦД, приводит к заметному росту энантиоселективности при разделении энантиомеров пропранолола и карведилола (Рис. 54).

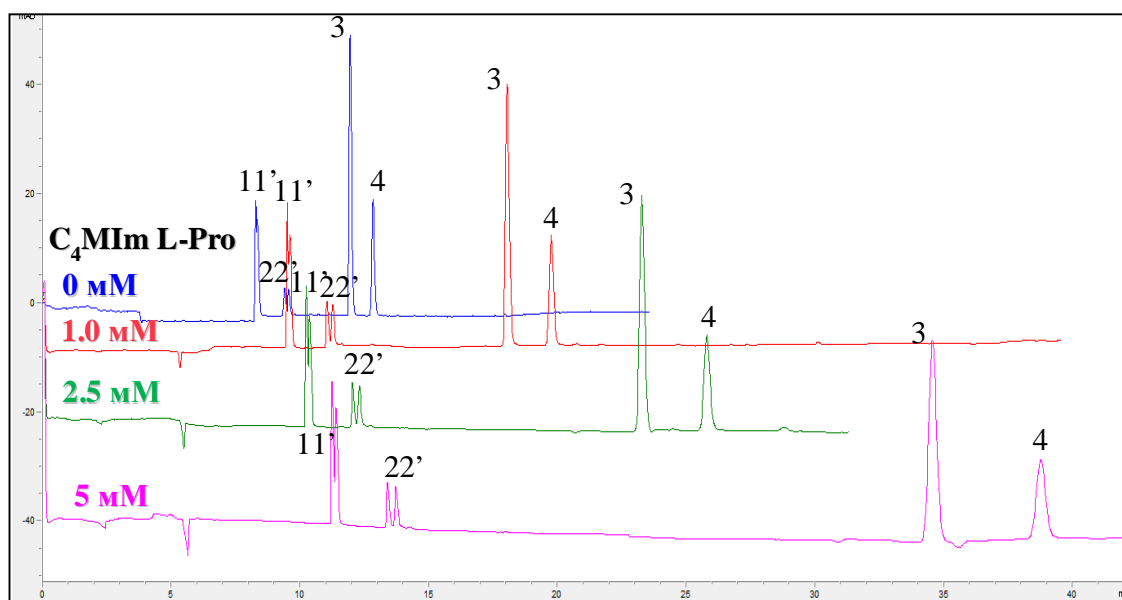


Рис. 54. Электрофореграмма рацемической смеси β -блокаторов и аминокислот при совместном введении в фоновый электролит ГП- β -ЦД и $[C_4MIm][L-Pro]$. Условия: система капиллярного электрофореза «Agilent-7100», фоновый электролит: 20 mM раствор NaH_2PO_4 , $pH = 2.5$ (доведенный до требуемого значения pH 0.1 M раствором HCl), 5 mM ГП- β -ЦД, 0-5 mM $[C_4MIm][L-Pro]$. Напряжение: +30 кВ, $\lambda=230$ нм. Аналиты: 1 - S-(-)-пропранолол, 1' - R-(+)-пропранолол, 2- S-(-)-карведилол, 2'-R-(+)-карведилол, 3-DL-Trp, 4-DL-Tyr.

Чтобы объяснить полученный результат, проведены контрольные эксперименты с L-Pro (5 мМ) и ахиральной ионной жидкостью C₄MImCl (5 мМ) в качестве второго модификатора. При добавлении L-Pro изменения факторов разрешения энантиомеров β-блокаторов находились в пределах погрешности. С другой стороны, природа катиона в молекуле ИЖ могла бы повлиять на разделение энантиомеров за счет модификации стенок кварцевого капилляра.

Энантиомеры аналитов могут включаться в полость β-ЦД и ассоциировать с положительно заряженным катионом ионной жидкости, сорбированной на поверхности кварцевого капилляра. Образование ассоциатов может происходить за счет π-π взаимодействий с имидазольной группой, а дополнительное образование водородных связей между энантиомерами и анионом аминокислотной ионной жидкости [C₄MIm][L-Pro] приведет к росту селективности разделения. Наибольшие значения R_s наблюдалось при концентрации 5 мМ [C₄MIm][L-Pro] (Рис. 55).

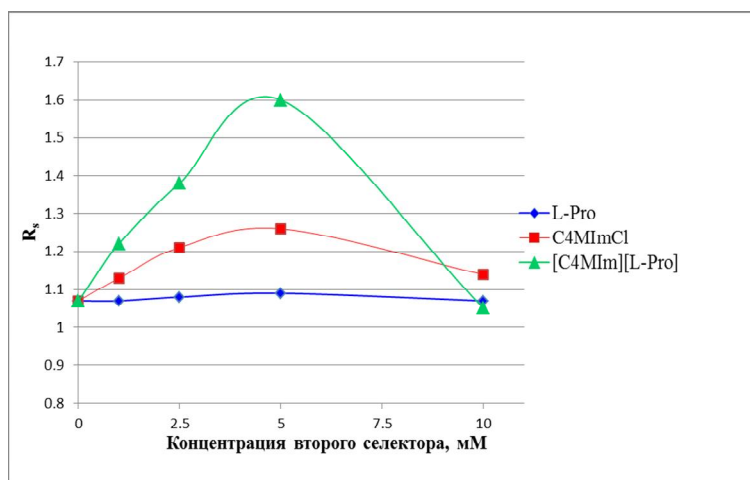


Рис. 55. Зависимость факторов разрешения (R_s) энантиомеров карведилола от концентрации и природы второго модификатора. Условия: система капиллярного электрофореза «СЕ-7100», фоновый электролит: 20 мМ раствор NaH₂PO₄, pH = 2.5 (доведенный до требуемого значения 0.1 М раствором HCl), 5 мМ ГП-β-ЦД. Напряжение: +30 кВ, λ=230 нм.

Достигнутые значения факторов разрешения для пропранолола ($R_s = 0.8$) и карведилола ($R_s = 1.6$) позволили перейти к определению соотношения энантиомеров действующих веществ лекарственных препаратов «Анаприлин» и «Карведилол Зентива».

Пробоподготовка лекарственных препаратов заключалась в гомогенизации таблетки с последующим растворением в 5 мл водно-ацетонитрильной смеси (3:1, объемн.) и центрифугированием; далее отбирали и анализировали надосадочную жидкость, разбавленную в 1000 раз. Полученное соотношение энантиомеров соответствовало заявленному в инструкции (Рис. 56, табл. 19).

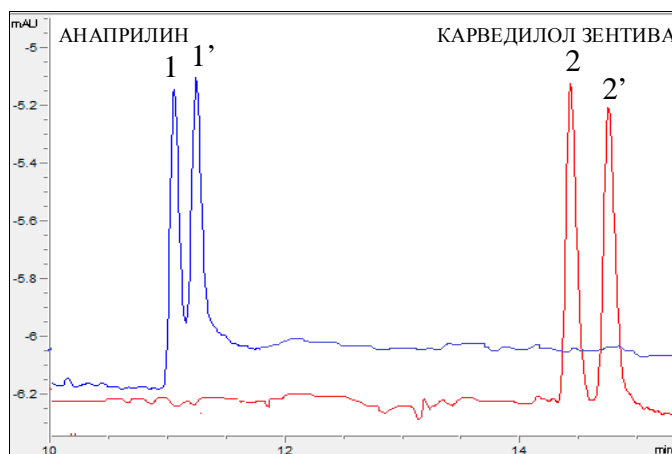


Рис. 56. Электрофореграмма лекарственных средств «Анаприлин» и «Карведилол Зентива». Условия: см. Рис. 54, 5 мМ $[C_4MIm][L-Pro]$.

Таблица 19. Характеристика и результаты анализа лекарственных препаратов.

Препарат	α , R_s	Содержание
«Анаприлин» («Медисорб», Россия) активное вещество – пропранолола гидрохлорид 40 мг	$\alpha = 1.02 \pm 0.01$ $R_s = 1.16 \pm 0.04$	R(+) -19.2 \pm 0.3 мг S (-) -17.9 \pm 0.3 мг
«Карведилол Зентива» («Zentiva», Чешская Республика) действующее вещество – карведилол 25 мг	$\alpha = 1.03 \pm 0.01$ $R_s = 1.86 \pm 0.05$	R(+) – 12.1 \pm 0.2 мг S (-) -11.9 \pm 0.2 мг

ГЛАВА VI. ИОННЫЕ ЖИДКОСТИ В КАЧЕСТВЕ ЭКСТРАГЕНТОВ

Другим направлением исследования стало изучение возможностей $C_6MImNTf_2$, C_6MImBF_4 , C_8MImBF_4 в качестве экстрагентов аминокислот и стероидных гормонов из водной фазы (Рис. 57).

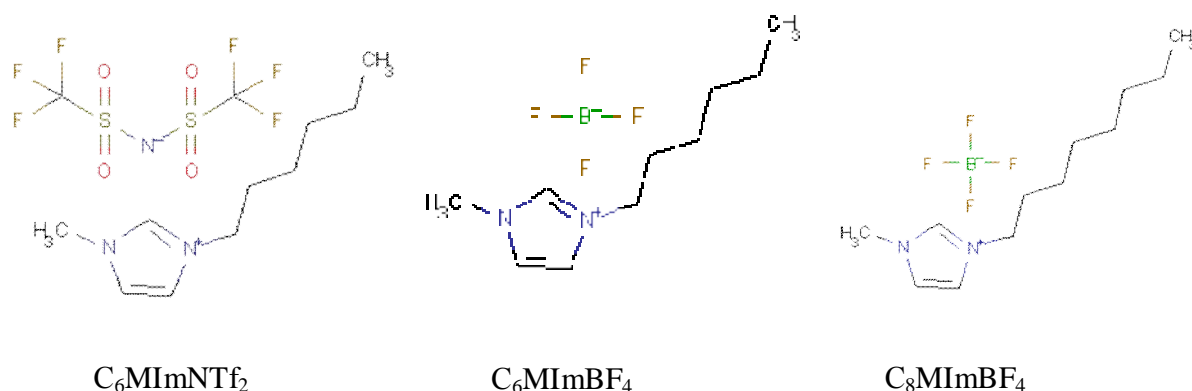


Рис. 57. Структуры исследуемых ионных жидкостей в качестве экстрагентов. $C_6MImNTf_2$ – 1-гексил-3-метилимидазолий бис(трифторметилсульфонил)имид, C_6MImBF_4 – 1-гексил-3-метилимидазолий тетрафторборат, C_8MImBF_4 – 3-метил-1-октилимидазолий тетрафторборат.

VI. 1. Извлечение аминокислот из водной фазы в ионные жидкости $C_6MImNTf_2$, C_6MImBF_4 , C_8MImBF_4

Изучены закономерности извлечения аминокислот из водной фазы в гидрофобные ионные жидкости $C_6MImNTf_2$, C_6MImBF_4 , C_8MImBF_4 при различном соотношении фаз [180]. При увеличении длины алкильного радикала в составе молекулы этих ионных жидкостей растет их гидрофобность. Поэтому сопоставление результатов, полученных при извлечении аминокислот, проводилось на примере триптофана – наиболее гидрофобного анализита (в режиме ОФ ВЭЖХ обладает наибольшими параметрами удерживания) (Рис. 22).

Показано, что в ряду $C_6MImNTf_2$, C_6MImBF_4 , C_8MImBF_4 максимальные степени извлечения триптофана (Trp) достигаются при использовании $C_6MImNTf_2$ в качестве экстрагента (Рис. 58а). Для 3,4-дигидроксифенилаланина (DOPA) и тирозина (Tyr) наблюдаются те же закономерности: наибольшие значения характерны именно с применением этой же ионной жидкости $C_6MImNTf_2$ (Рис. 58б).

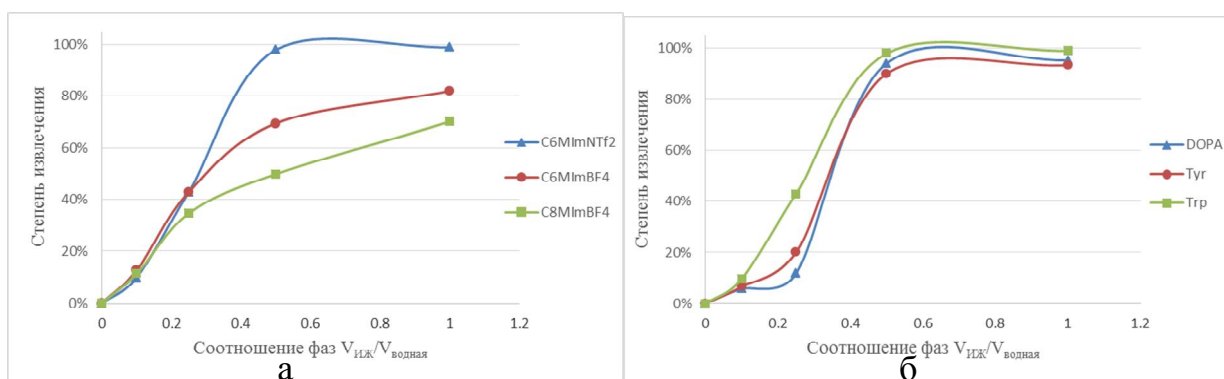


Рис. 58. (а) Зависимость степеней извлечения триптофана в ионные жидкости от соотношения фаз *ИЖ:водный раствор* (pH = 1.0). (б) Зависимость степеней извлечения аминокислот от соотношения фаз $C_6MImNTf_2$:*водный раствор* (pH = 1.6).

Поскольку степени извлечения триптофана снижаются с увеличением длины алкильного радикала в ИЖ, можно заключить, что гидрофобные взаимодействия между аналитами и экстрагентом не являются в этом процессе доминирующими. После проведения экстракции обнаружено увеличение концентрации ионной жидкости в водной фазе, что указывает на ионообменный механизм извлечения: положительно заряженные аминокислоты переходят из водной фазы в ИЖ. Однако любая система должна быть электронейтральна (т.е. содержать одинаковое число положительно и отрицательно заряженных ионов), поэтому такое же количество катионов должно перейти в водный раствор. Чем больше гидрофобность ионной жидкости, тем меньше катионов замещенного имидазолия переходят в воду, следовательно, степень извлечения понижается.

Для изучения процесса экстракции исследована зависимость степеней извлечения аминокислот от pH водной фазы (Рис. 59).

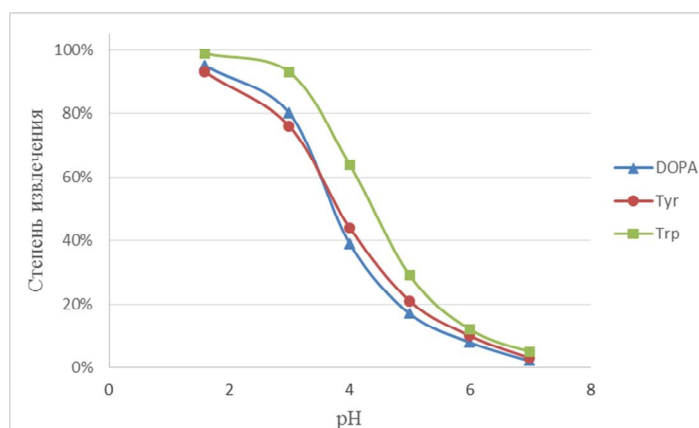


Рис. 59. Зависимость степеней извлечения аминокислот в ионную жидкость $C_6MImNTf_2$ от pH водной фазы ($V_{ИЖ}/V_{водная} = 1:1$, объемн.).

Изоэлектрические точки выбранных аминокислот находятся в диапазоне 5.6-5.9, и при pH <5.6 аналиты заряжены положительно за счет протонирования аминогруппы. Поскольку степени извлечения увеличиваются с понижением pH

водной фазы, то наиболее вероятным механизмом экстракции является ионообменный.

Для увеличения степеней извлечения аминокислот использованы процессы комплексообразования протонированной первичной аминогруппы с полостью 18-краун-6. (Рис. 60а). Аналитическая форма формирующегося ассоциата более гидрофобна, чем исходных аналитов, и степень извлечения их в гидрофобные ионные жидкости возрастает (Рис. 60б).

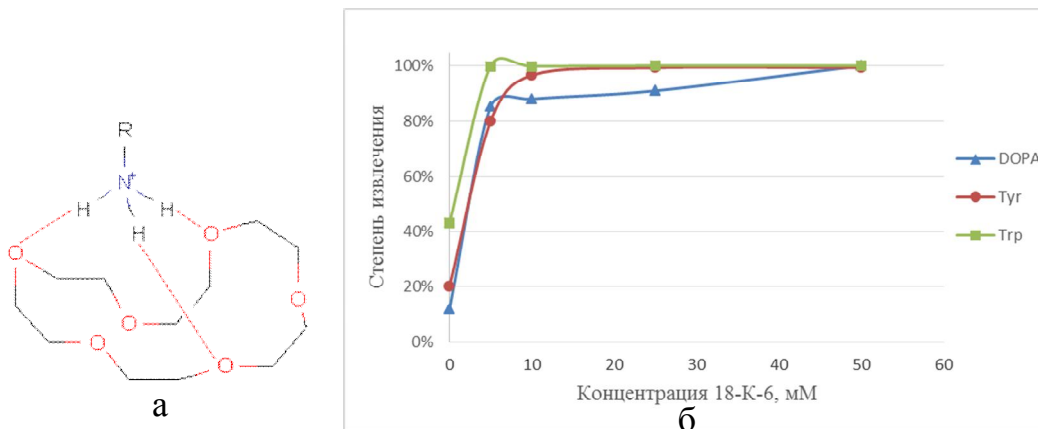


Рис. 60. (а) Комплекс 18-К-6 с протонированными по первичной аминогруппе аналитом. (б) Зависимость степеней извлечения аминокислот от концентрации макроцикла 18-краун-6 в водной фазе при постоянном соотношении $C_6MImNTf_2$: водная фаза (1:4, объемн.).

Обратное извлечение аминокислот из ионной жидкости протекает при увеличении pH водной фазы (Рис. 61).

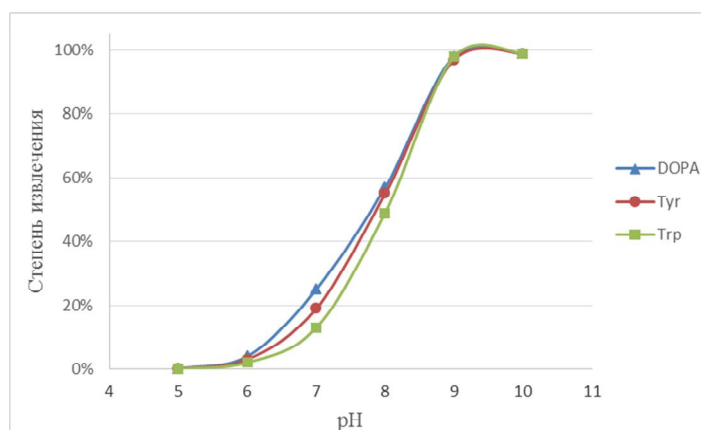


Рис. 61. Зависимость степеней обратного извлечения аминокислот от pH водной фазы при постоянном соотношении $C_6MImNTf_2$: водная фаза (1:1, объемн.).

VI. 2. Извлечение стероидных гормонов из водной фазы в ионные жидкости $C_6MImNTf_2$, C_6MImBF_4 , C_8MImBF_4

VI.2.1. Жидкостно-жидкостная экстракция стероидных гормонов

Стероидные гормоны— гидрофобные соединения, поэтому применение гидрофобных ионных жидкостей для экстракции в этом случае предпочтительно. Как и в случае аминокислот, найдена зависимость степеней извлечения стероидных гормонов от соотношения *ИЖ:водная фаза*.

Показано, что степени извлечения наименее гидрофобного кортизола (F) растут при замене аниона в составе ИЖ бис(трифторметилсульфонил)имида на тетрафторборат и при увеличении длины алкильного радикала (Рис. 62а).

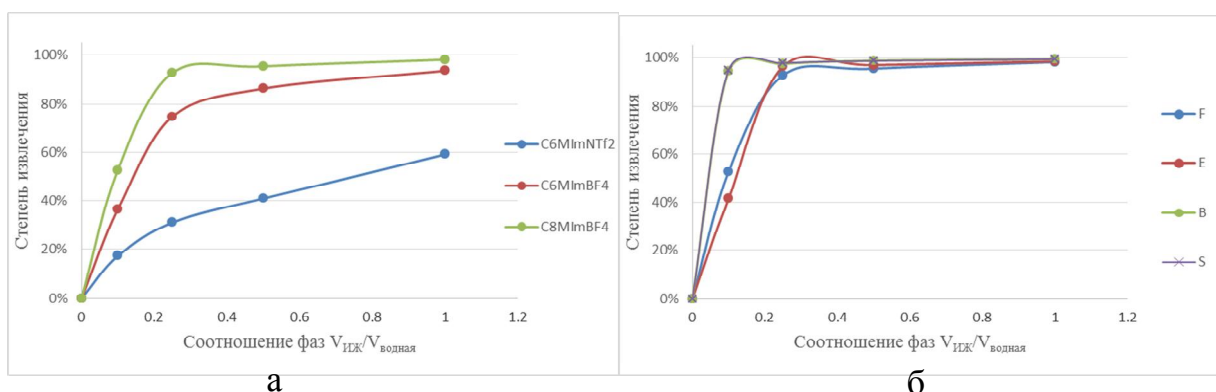


Рис. 62. (а) Зависимость степеней извлечения кортизола (F) в ионные жидкости от соотношения фаз *ИЖ:водный раствор*.

(б) Зависимость степеней извлечения стероидных гормонов от соотношения *C₈MImBF₄:водная фаза*.

Установлено, что степень извлечения в ионную жидкость возрастает с увеличением гидрофобности анализата. Ионная жидкость C₈MImBF₄ является наиболее гидрофобной из выбранных, поэтому степени извлечения кортикостероидов в этом случае максимальные. Для кортикостерона (B) и 11-дезоксикортизон (S) наблюдается практически количественная экстракция C₈MImBF₄ при соотношении органической и водной фазы равном 1:10 (объемн.).

Исследованы по аналогии с аминокислотами экстракционные процессы, включающие комплексообразование стероидных гормонов с макроциклами, имеющими гидрофобную полость (β -циклодекстрин и его гидроксипроизводное) (Рис. 34). В этом случае отмечено снижение степеней извлечения анализатов: поверхность образующегося комплекса более гидрофильна по сравнению с полостью макроцикла, и степени извлечения в гидрофобную ионную жидкость снижаются (Рис. 63).

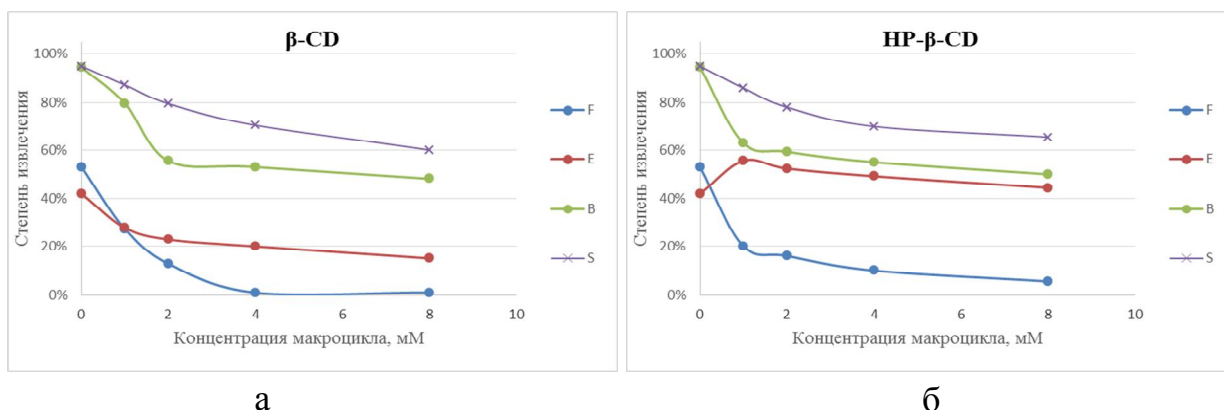


Рис. 63. Зависимость степеней извлечения стероидных гормонов в C_8MImBF_4 от концентрации макроцикла в водной фазе. Соотношение C_8MImBF_4 :водная фаза 1:10 (объемн.): (а) в случае β-циклодекстрина; (б) для - (2-гидроксипропил)-β-циклодекстрина.

Резкое снижение степени извлечения кортизола (F) при увеличении концентрации макроцикла в водной фазе объясняется предпочтительностью процесса включения аналита в полость β-циклодекстрина по сравнению с переходом в ионную жидкость.

Исследована возможность обратного извлечения стероидных гормонов из ионных жидкостей. Обычно для извлечения гормонов из водной фазы в условиях жидкостно-жидкостной экстракции используют дихлорметан или хлороформ. Однако эти растворители хорошо смешиваются с гидрофобными ионными жидкостями. Использование *n*-гептана в качестве экстрагента для обратной экстракции также не привело к удовлетворительным результатам: степень извлечения не превысила 2 % для всех аналитов.

Изучено влияние процесса комплексообразования на эффективность обратной экстракции кортикостероидов. С этой целью в водную фазу вводились различные концентрации (2,5-10 мМ) β-ЦД и его гидроксипропилпроизводного. Значения степеней извлечения не превысили 9 % (Рис. 64).

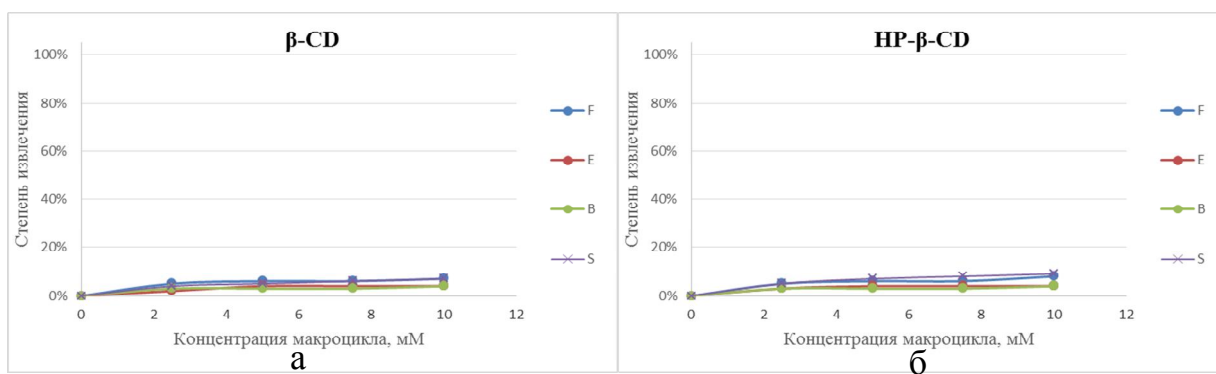


Рис. 64. Зависимость степеней обратного извлечения стероидных гормонов из C_8MImBF_4 от концентрации макроцикла в водной фазе. Соотношение C_8MImBF_4 :водная фаза 1:1 (объемн.): (а) в случае β-циклодекстрина; (б) для - (2-гидроксипропил)-β-циклодекстрина.

Именно поэтому был далее предложен нами вариант дисперсионной микроэкстракции с участием C_8MImBF_4 .

VI.2.1. Дисперсионная микроэкстракция стероидных гормонов

Дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция (*dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME*) очень проста в реализации: смешивание водного образца, содержащего аналит, и малого количества (мкл) экстрагента, не растворимого в воде, с помощью диспергатора (0.5-1 мл), который, в свою очередь, в равной степени хорошо смешивается как с экстрагентом, так и с водой (Рис. 65).

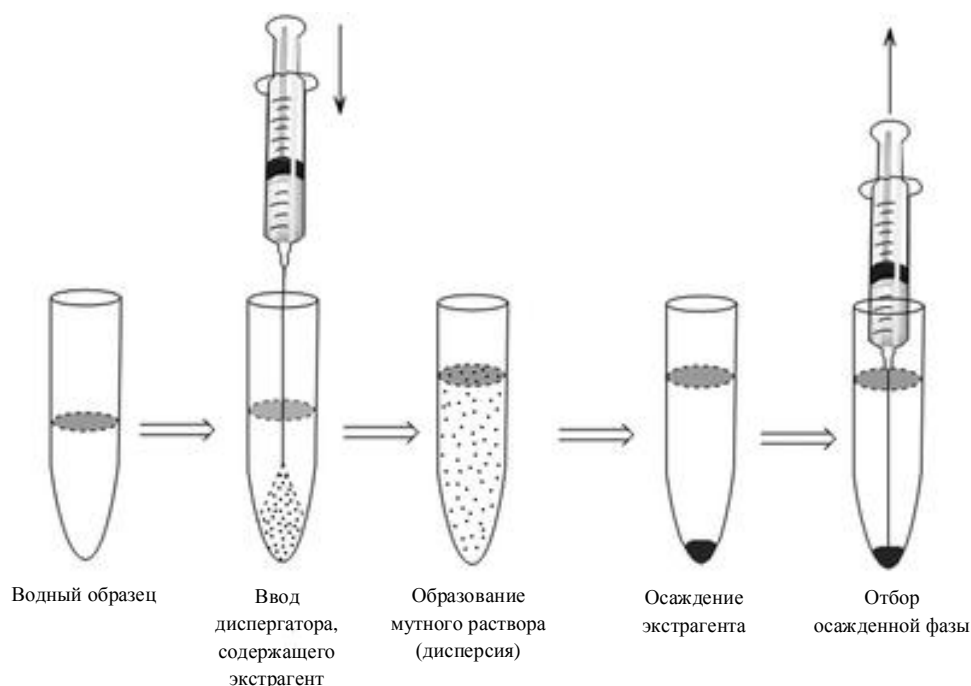


Рис. 65. Общая схема дисперсионной жидкостно-жидкостной экстракции.

Принимая во внимание выявленные закономерности экстракции стероидных гормонов в гидрофобные ионные жидкости, в качестве экстрагента был выбран 3-метил-1-октилимидазолий тетрафторборат (C_8MImBF_4). Отработка процедуры микроэкстракции заключалась в варьировании природы диспергатора (метанол, ацетонитрил, ацетон), его объема (0.1-1.5 мл) и объема экстрагента (50-250 мкл). Большие степени извлечения стероидных гормонов из водной фазы достигались при использовании в качестве диспергатора ацетона (табл. 12).

Изучено влияние объема диспергатора и ионной жидкости C_8MImBF_4 на степени извлечения кортикостероидов (Рис. 66).

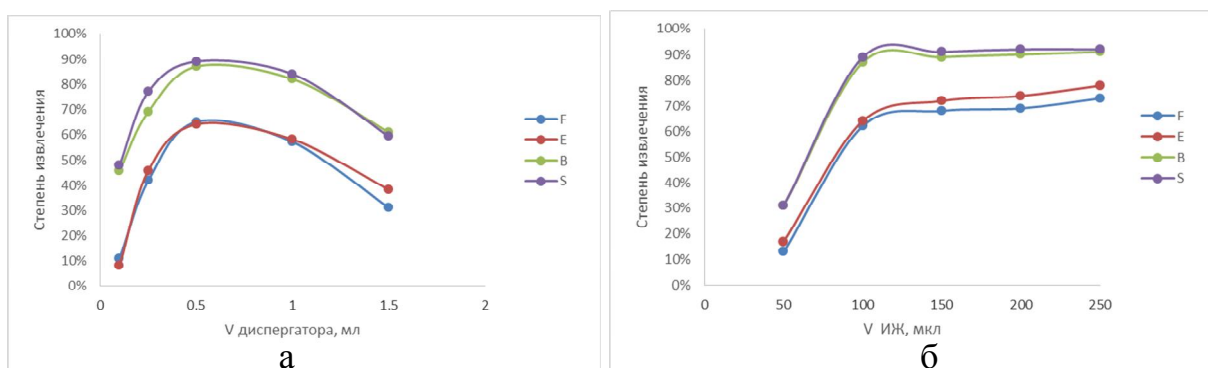


Рис. 66. Зависимость степеней извлечения стероидных гормонов от объема ацетона (а) и ионной жидкости C_8MImBF_4 (б).

Рост степеней извлечения стероидных гормонов на начальном этапе объясняется повышением эффективности «распыления» экстрагента. Однако при увеличении концентрации ацетона в водной фазе выше 20 % (объемн.), наблюдается растворение ИЖ, что приводит к снижению степеней извлечения.

Найден требуемый объем диспергатора - 0.5 мл. При увеличении объема ИЖ наблюдается увеличение степеней извлечения аналитов, что согласуется и с результатами жидкостно-жидкостной экстракции.

ГЛАВА VII. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ

Установленные закономерности на модельных системах позволили предложить схемы электрофоретического определения аминокислот, катехоламинов и стероидных гормонов в биологических жидкостях (Рис. 67-69).

VII.1. Определение аминокислот в образцах мочи

При определении аминокислот в образцах мочи ионные жидкости применялись как на стадии извлечения аналитов, так и при их электрофоретическом разделении (Рис. 67) [180].

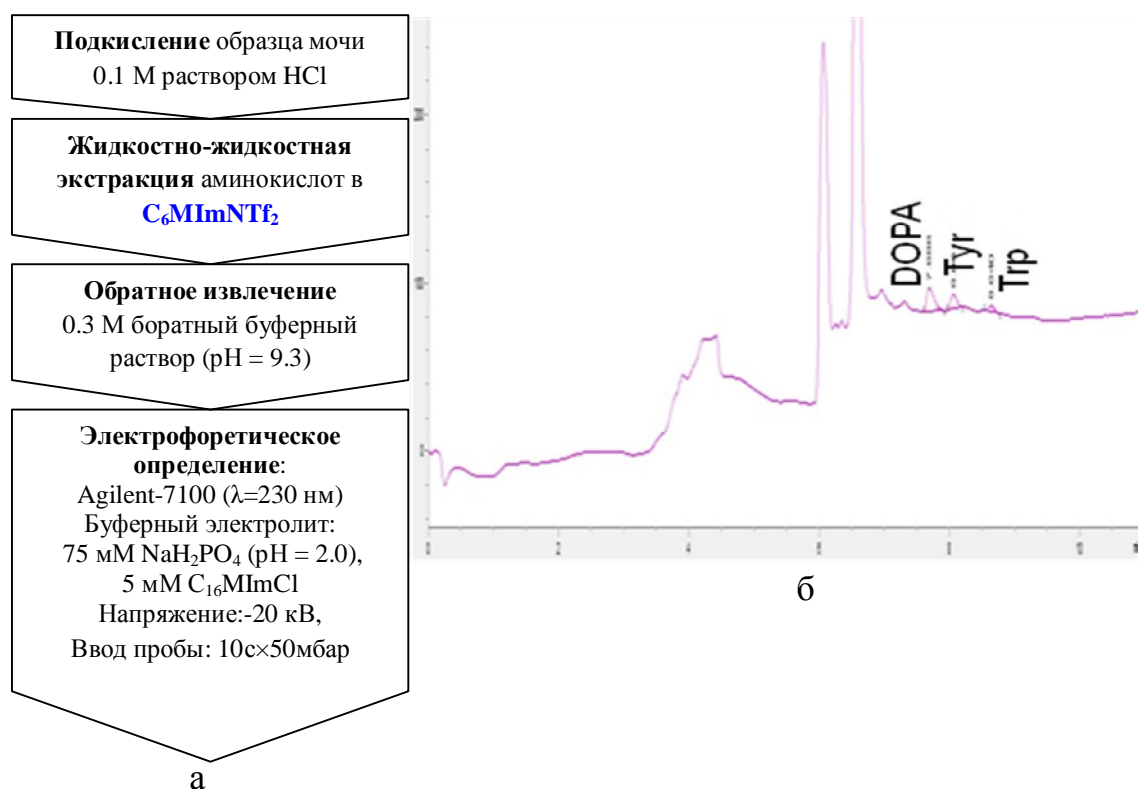


Рис. 67. (а) Схема определения аминокислот в образцах мочи. (б) Электрофореграмма образца мочи в оптимизированных условиях. Условия: Agilent-7100, 75 mM фосфатный буферный электролит (pH=2), 5 mM $C_{16}MImCl$, λ - 230 нм [180].

Наибольшие степени извлечения аминокислот наблюдались в условиях комплексообразования с участием 18-K-6. Однако при электрофоретическом определении аналитов в режиме МЭКХ разделение характеризуется низкой эффективностью, поскольку имеют место конкурентные взаимодействия аминокислот за полость макроцикла и мицелл, образованных ионной

жидкостью, что проявляется в уширении пиков аналитов. Чтобы избежать этого, извлечение аминокислот из мочи проводили в отсутствии краун-эфира и с использованием большего объема ионной жидкости (соотношение фаз $C_6MImNTf_2$:вода – 3:4).

Методом стандартной добавки определены степени извлечения аналитов, и проведен количественный анализ аминокислот в образцах мочи (табл. 20, Рис. 67б). Пределы обнаружения составили 30-55 нг/мл.

Таблица 20. Концентрация и степени извлечения аминокислот из образцов мочи

Аминокислота	Содержание в моче, мкг/мл	Добавка, мкг	Найдено, мкг/мл	Степень извлечения, %	ПО, нг/мл
DOPA	14.4±1.3	25.0	38.5±2.2	96±5	52±2
Тур	8.6±0.9	25.0	31.7±2.1	92±4	55±2
Trp	4.3±0.7	50.0	54.2±3.3	100±4	30±3

VII.2. Определение катехоламинов в образцах мочи

Пределы обнаружения биогенных аминов, достигнутые с использованием капилляров с иммобилизованной ионной жидкостью и с электрокинетическим вводом пробы в условиях МЭКХ, в принципе, позволяют анализировать образцы мочи без предварительной пробоподготовки. Однако в биологическом материале присутствуют другие компоненты (креатинин, мочеви́на, пигменты) в достаточно высоких концентрациях (мкг/мл), что затрудняет определение аналитов в оптимизированных условиях. Поэтому требовалась стадия сорбционного концентрирования биогенных аминов на оксиде алюминия [179].

В результате проведено количественное определение катехоламинов в образцах мочи (Рис. 68): $C(A) = 29 \pm 4$ нг/мл, $C(NA) = 15 \pm 4$ нг/мл, $C(DA) = 62 \pm 8$ нг/мл.

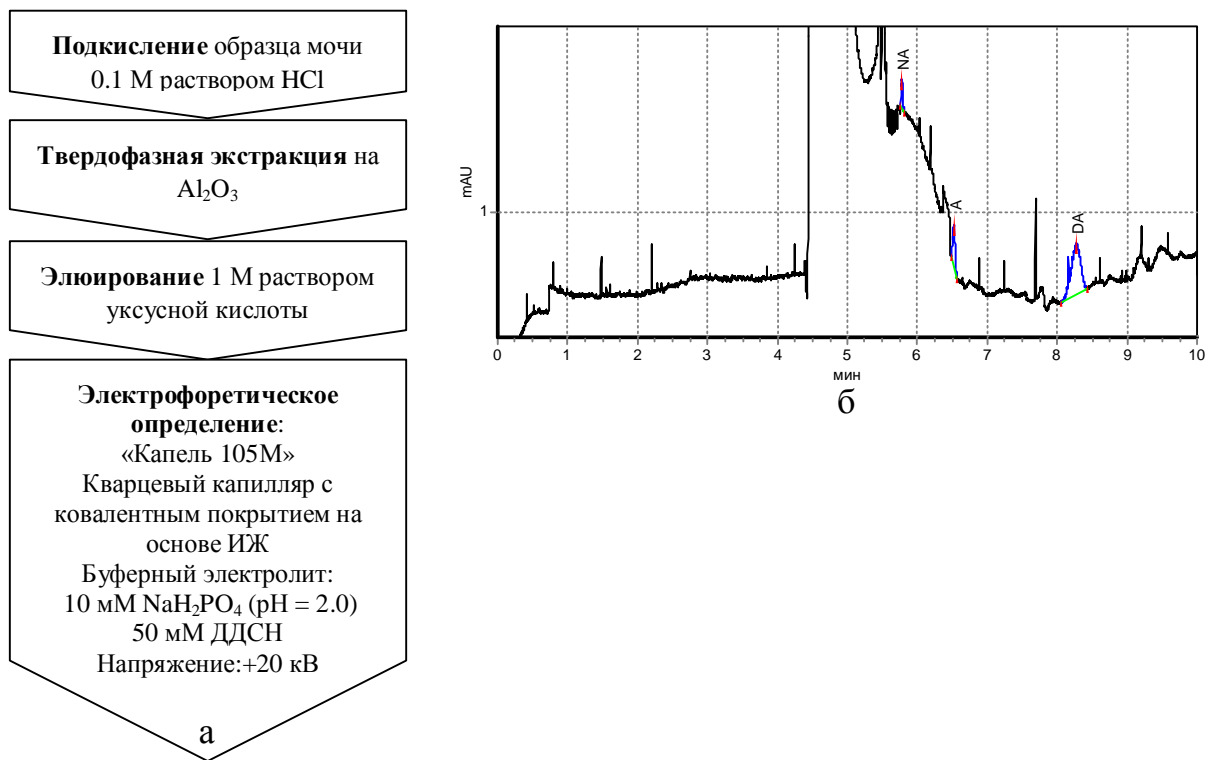


Рис. 68. а) Схема определения катехоламинов в образцах мочи. б) Электрофореграмма образца мочи в оптимизированных условиях. Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М», 10 мМ NaH₂PO₄, pH = 2.0 (доведенный 0.1 М HCl), 50 мМ ДДСН. Напряжение 20 кВ, ввод пробы 50 с 50 мбар, детектирование – 220 нм. Аналиты: NA – норадреналин, А – адреналин, DA – дофамин.

VII.3. Определение стероидных гормонов в образцах мочи

Предложена схема электрофоретического определения стероидных гормонов в образцах мочи с применением на стадии пробоподготовки дисперсионной жидкостно-жидкостной экстракции в C₈MImBF₄ (Рис. 69).

Методом стандартной добавки найдены степени извлечения стероидных гормонов из образцов мочи в процессе дисперсионной микроэкстракции (табл. 21).

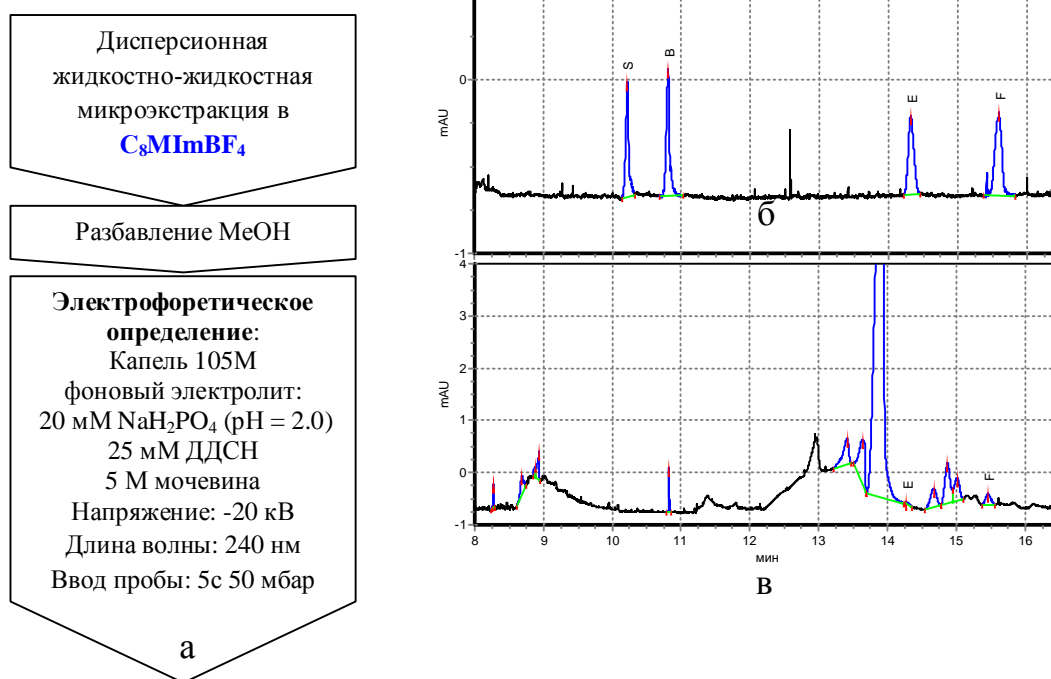


Рис. 69. (а) Схема определения стероидных гормонов в образцах мочи. Электрофореграммы стандартной смеси стероидных гормонов (б) и образца мочи (в). Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М», 25 мМ NaH_2PO_4 , рН = 2.0 (доведенный 0.1 М HCl), 25 мМ ДДСН, 5 М раствор мочевины. Условия: система капиллярного электрофореза «Капель-105М». Аналиты: F-кортизол, E – кортизон, S – 11-дезоксикортизол, B – кортикостерон.

Таблица 21. Степени извлечения стероидных гормонов из образцов мочи в процессе дисперсионной жидкостно-жидкостной микроэкстракции в C_8MImBF_4 .

Аналит	Содержание в моче, нг/мл	Добавка, нг/мл	Найдено, нг/мл	Извлечение, %	ПО, нг/мл
Кортизол (F)	99±6	100	168±9	69±7	12±3
Кортизон (E)	18±4	100	87±8	74±7	11±3
Кортикостерон (B)	-	100	92±5	92±5	8±2
11-Дезоксикортизол (S)	-	100	93±4	93±4	8±2

Полученные степени извлечения кортикостероидов из образцов мочи оказались выше, чем в случае модельных систем, что обусловлено высокой концентрацией солевых компонентов в биологической жидкости. Это благоприятствует массопереносу стероидных гормонов из водной фазы в органическую. Достигнутые пределы обнаружения составили 8-12 нг/мл.

VII.4. Сопоставление аналитических характеристик изученных ионных жидкостей при экстракции и электрофоретическом определении аналитов различной полярности

Исследуемые в работе ионные жидкости $C_{12}MImCl$ и $C_{16}MImCl$ динамически модифицируют стенки кварцевого капилляра в условиях КЭ, обращая ЭОП и влияя на эффективность и селективность разделения аминокислот и катехоламинов. Изменение миграционных характеристик сильнее проявляется для более основных аналитов, поскольку ИЖ блокируют действие силанольных групп на поверхности капилляра.

Способность указанных ИЖ образовывать мицеллы с формированием псевдостационарной фазы позволяет применять их для разделения нейтральных аналитов в условиях МЭКХ. В таких системах имеют место не только взаимодействия аналита с полостью мицеллы, но π , π -, электростатические и

водородные, обуславливающие увеличение селективности разделения по сравнению с классическим катионным детергентом – ЦТАБ.

Аминокислотные ионные жидкости в качестве хиральных селекторов сочетают в себе свойства ахиральных ИЖ и аминокислот, что обеспечивает более высокие факторы разрешения энантиомеров и в условиях ЛОКЭ, и при использовании смешанных селекторов.

Гидрофобные ионные жидкости прекрасно проявили себя при извлечении аналитов различной полярности. Одни и те же экстрагенты могут реализовывать различные механизмы процессов экстракции: за счет гидрофобных взаимодействий, электростатических и ионообменных, что позволяет регулировать селективность извлечения аналитов из водных растворов путем изменения pH или введением комплексообразующих добавок.

В табл. 22 представлены сравнительные результаты литературных данных и полученные в данной работе. Степени извлечения аналитов различной природы и пределов обнаружения сопоставимы, а в ряде случаев в наших условиях достигнуты лучшие результаты.

Таблица 22. Сопоставление полученных результатов с литературными данными.

Аналиты	Ионные жидкости - экстрагенты			
	Экстрагент	Степени извлечения		
Аминокислоты	C ₆ MImNTf ₂	Образцы мочи: тирозин 92±4 %, 3,4-дигидроксифенилаланин - 96±5 %, триптофан 100±4%		
	C ₄ MImPF ₆ [142]	Лекарственные препараты: триптофан 99±2%		
Стероидные гормоны	C ₈ MImBF ₄	Дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция Образцы мочи: кортизол (F) - 69±7%, кортизон (E) - 74±7%, кортикостерон (B) - 92±5%, 11-дезоксикортизол(S) - 93±4%. Жидкостно-жидкостная экстракция Водные растворы: кортизол (F) - 97±3%, кортизон (E) - 98±2%, кортикостерон (B) - 98±2%, 11-дезоксикортизол(S) - 98±2%		
	CHCl ₃ [186]	Жидкостно-жидкостная экстракция Образцы мочи: кортизол (F) - 102±3%, кортизон (E) - 94±3%, кортикостерон (B) - 70±3%, 11-дезоксикортизол(S) - 71±3%.		
Модификаторы электрофоретических систем				
	Модификатор	Факторы разрешения (R _s)	Пределы обнаружения (ПО), мкг/мл	Эффективность (N), тыс. т.т./м
Аминокислоты	5 мМ C ₁₂ MImCl	0.9-1.5	0.5-2.0	270-300
	Ковалентное покрытие на основе ИЖ	1.6-2.7	0.2-0.8	200-450
Биогенные амины	9 мМ C ₁₂ MImCl	0.5-1.6	0.7-1.2	110-330
	Ковалентное покрытие на основе ИЖ	1.5-5.5	0.3-0.5	200-400
	Псевдостационарная фаза	Факторы разрешения	Пределы обнаружения	Эффективность (N),

		(R _s)	(ПО), мкг/мл	тыс. т.т./м
Стероидные гормоны	15 мМ C ₁₆ MImCl + 10 мМ β-ЦД	1.8-4.3	2	160-450
	15 мМ C ₁₆ MImCl + 12 мМ – ГП-β-ЦД [121]	>1.4	0.3-0.4	250-750
	25 мМ ДДСН + 0.5 мМ C ₁₆ MImCl [121]	>0.7	0.2	850-1000
	80 мМ ДДСН + 5 М мочевины [121]	>1.3	5	100-150
Варианты внутрикапиллярного on-line концентрирования на ковалентных покрытиях				
	Условия	Вариант концентрирования	SEF _h	Пределы обнаружения (ПО), нг/мл
Аминокислоты	Ковалентное покрытие на основе ИЖ	Стэкинг с большим объемом вводимой пробы	58-85	11-95
		Сви́пинг с большим объемом вводимой пробы	110-180	5-40
Биогенные амины		Стэкинг с большим объемом вводимой пробы	105-135	11-17
		Сви́пинг в сочетании с электростэкингом	930-1500	1-2
Хиральные селекторы				
	Хиральный селектор	Факторы разрешения (R _s), Селективность (α)		
Энантиомеры аминокислот	[C ₄ MIm][L-Pro] (pH=12.2) метод ЛОКЭ	Тирозин: R _s - 2.2±0.2, α – 1.17±0.07 Триптофан: R _s - 5.2±0.3, α – 1.25±0.07		
	[C ₆ MIm][L-Pro] (pH=4.0) метод ЛОКЭ [129]	Тирозин: R _s - 4.27, α – 1.09 Триптофан: R _s - 3.52, α – 1.08		
Энантиомеры β-блокаторов	5 мМ [C ₄ MIm][L-Pro]+ 5 мМ ГП-β-ЦД	Пропранолол R _s - 1.16, α – 1.02 Карведилол R _s - 1.86, α – 1.03		
	30 мМ ТМА-L-Arg + 20 мМ ГП-β-ЦД [187]	Пропранолол R _s - 2.36, α – 1.034		

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлено, что введение в фоновый электролит имидазолиевых ионных жидкостей ($C_{12}MImCl$, $C_{16}MImCl$) способствует динамической модификации стенок кварцевого капилляра, созданию анодного электроосмотического потока и приводит к росту эффективности (в КЗЭ) и селективности разделения (в МЭКХ) в 2-3 раза аминокислот и катехоламинов.

2. Выявлена возможность ионной жидкости $C_{16}MImCl$ в составе фонового электролита в концентрации, превышающей критическую концентрацию мицеллообразования, выступать в качестве псевдостационарной фазы и обеспечивать разделение нейтральных стероидных гормонов.

3. Предложен способ синтеза стабильного ковалентного покрытия стенок кварцевого капилляра на основе N-бутилимидазолиевой ионной жидкости, обеспечивший высокую воспроизводимость параметров миграции аналитов, и в сочетании с *on-line* концентрированием (сви́пинг с большим объемом вводимой пробы, сви́пинг с электростэкингом) позволивший снизить пределы обнаружения катехоламинов и аминокислот в 100-1500 раз по сравнению с немодифицированным капилляром.

4. Показано, что применение аминокислотной ионной жидкости $[C_4MIm][L-Pro]$ с хиральным анионом в качестве лиганда с солями меди (II) в составе фонового электролита (pH 12.2) позволяет разделять энантиомеры триптофана и тирозина с высокими значениями факторов разрешения (2.2-5.2).

5. Обнаружен синергетический эффект совместного введения в фоновый электролит системы хиральных селекторов ионной жидкости $[C_4MIm][L-Pro]$ и (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрина, проявившийся в увеличении факторов разрешения энантиомеров β -блокаторов (пропранолола и карведилола) в 1.5 раза.

6. Предложена схема пробоподготовки образцов мочи для электрофоретического определения аминокислот с извлечением в ионную жидкость $C_6MImNTf_2$ в качестве экстрагента со степенями извлечения 92 - 100 %. Пределы обнаружения 30-55 нг/мл.

7. Предложена схема пробоподготовки образцов мочи для электрофоретического определения стероидных гормонов, включающая дисперсионную микроэкстракцию в ионную жидкость C_8MImBF_4 . Степени извлечения – 69-93% , пределы обнаружения – 8-12 нг/мл.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ИЖ – ионные жидкости

RTILs («room temperature – ionic liquids») – ионные жидкости с температурой плавления, близкой к комнатной

ККМ – критическая концентрация мицеллообразования

ПАВ – поверхностно-активное соединение

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ОФ ВЭЖХ – обращенно-фазная высокоэффективная жидкостная хроматография

ПФ- подвижная фаза

НФ – неподвижная фаза

ДДСН – додецилсульфат натрия

ЦТАБ – цетилтриметиламмоний бромид

ННЛС (hydrophilic interaction liquid chromatography) – гидрофильная хроматография

ПАУ- полиароматические углеводороды

КЭХ – капиллярная электрохроматография

КЭ – капиллярный электрофорез

НВКЭ – неводный капиллярный электрофорез

КЗЭ – капиллярный зонный электрофорез

МЭКХ – мицеллярная электрокинетическая хроматография

ЛОКЭ – лигандообменный капиллярный электрофорез

ЭОП – электроосмотический поток

АТРЕ (aqueous two-phase extraction) – водная двухфазная экстракция

ТФЭ – твердофазная экстракция

МЕ - микроэкстракция

SDME (single-drop microextraction) – микроэкстракция в каплю

HLLME (homogeneous liquid–liquid microextraction) – гомогенная жидкостно-жидкостная микроэкстракция

DLLME (dispersive liquid-liquid microextraction) - дисперсионная жидкостно-жидкостная микроэкстракция

[C₂MIm][L-Pro] – 3-метил-1-этилимидазолий L-пролинат

[C₄MIm][L-Pro] - 1-бутил – 3 -метилимидазолий L-пролинат

[C₈MIm][L-Pro] - 3-метил-1-октилимидазолий L-пролинат

[C₁₂MIm][L-Pro] - 1-додецил – 3 -метилимидазолий L-пролинат

[C₄MIm][L-Glu] - 1-бутил – 3 -метилимидазолий L-глутамат

C₄MImCl - 1-бутил – 3 –метилимидазолий хлорид

C₁₂MImCl - 1-додецил – 3 -метилимидазолий хлорид

C₁₆MImCl - 1-гексадецил – 3 -метилимидазолий хлорид

C₆MImNTf₂ – 1-гексил – 3-метилимидазолий
бис(трифторметилсульфонил)имид

C₆MImBF₄ - 1-гексил – 3-метилимидазолий тетрафторборат

C₈MImBF₄ - 3-метил – 1-октилимидазолий тетрафторборат

β-ЦД - β - циклодекстрин

ГП-β-ЦД- (2-гидроксипропил)- β – циклодекстрин

ДМФА – диметилформамид

A – адреналин

NA - норадреналин

NMN - норметанефрин

DA - дофамин

Tyr - тирозин

Trp - триптофан

DOPA – 3,4-дигидроксифенилаланин

F - кортизол

E - кортизон

B – кортикостерон

S – 11-дезоксикортизол

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shamsi S.A., Danielson N.D.* Utility of ionic liquids in analytical separations // J. Sep. Sci. 2007 V. 30 P. 1729.
2. *Berthod A., Ruiz-Angel M.J., Carda-Broch S.* Ionic liquids in separation techniques// J. Chromatogr. A. 2008 V. 1184 P. 6.
3. *Yang Q., Photolytic D.D.* Photolytic degradation of chlorinated phenols in room temperature ionic liquids // J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 2004 V. 165 P. 229.
4. *Huddleston J.G., Visser A.E., Reichert W.M., Willauer H.D., Broker G.A., Rogers R.D.* Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation // Green Chem. 2001 V. 3 P. 156.
5. *Ngo H.L., LeCompte K., Hargens L., McEwen A.B.* // Thermochim. Acta 2000 V. 357 P. 97.
6. *Suarez P.A.Z., Einloft S., Dullius G.E.L., de Souza R.F., Dupond J.* Synthesis and physical-chemical properties of ionic liquids based on 1- n-butyl-3-methylimidazolium cation // J. Chim. Phys. 1998 V. 95 P. 1626.
7. *Bonhôte P., Diaz A.-P., Papageogiou N., Kalyanasundaram K., Grätzel M.* Hydrophobic, Highly Conductive Ambient-Temperature Molten Salts // Inorg. Chem. 1996 V. 35. P. 1168.
8. *Holbrey J.D., Seddon K.R.* The phase behaviour of 1-alkyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborates; ionic liquids and ionic liquid crystals // J. Chem. Soc. Dalton Trans. 1991 V. 2133
9. *Hagiwara R., Ito Y.* Room temperature ionic liquids of alkylimidazolium cations and fluoroanions // J. Fluor. Chem. 2000. V. 105 P. 221.
10. *Seddon K.R., Stark A., Torres M.-J.* Influence of chloride, water, and organic solvents on the physical properties of ionic liquids // Pure Appl. Chem. 2000 V. 72 P.

2275.

11. *Larsen A.S., Holdbrey J.D., Tham F.S., Reed C.A.* Designing Ionic Liquids: Imidazolium Melts with Inert Carborane Anions // *J. Am. Chem. Soc.* 2000 V. 122 P. 7264.

12. *Ho T.D., Zhang C., Hantao L.W., Anderson J.L.* Ionic Liquids in Analytical Chemistry: Fundamentals, Advances, and Perspectives // *Anal. Chem.* 2014 V. 86 P. 262.

13. *Walden P.* Molecular weights and electrical conductivity of several fused salts // *Bull. Acad. Imp. Sci.* 1914 V. 1800 P. 405.

14. *Wilkes J.S., Levisky J.A., Wilson R.A., Hussey C.L.* Dialkylimidazolium chloroaluminate melts: a new class of room-temperature ionic liquids for electrochemistry, spectroscopy and synthesis // *Inorg. Chem.* 1982 V. 21. V. 1263.

15. *Wilkes J.S., Zaworotko M.J.* Air and water stable 1-ethyl-3-methylimidazolium based ionic liquids // *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1992 V. 13 P. 965.

16. *Pringle J.M., Golding J., Baranyai K., Forsyth C.M., Deacon G.B., Scott J.L., MacFarlane D.R.* The effect of anion fluorination in ionic liquids—physical properties of a range of bis(methanesulfonyl)amide salts // *New J. Chem.* 2003 V. 27 P. 1504.

17. *Jungnickel C., Łuczak J., Ranke J., Fernandez J., Muller A., Thoming J.* Micelle formation of imidazolium ionic liquids in aqueous solution // *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 2008 V. 316 P. 278.

18. *Baltazar Q. Q., Chandawalla J., Sawyer K., Anderson J. L.* Interfacial and micellar properties of imidazolium-based monocationic and dicationic ionic liquids // *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects* 2007 V. 302 P.150.

19. *Łuczak J., Hupka J., Thoming J., Jungnickel C.* Self-organization of imidazolium ionic liquids in aqueous solution // *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects* 2008

V. 329 P. 125.

20. *Dong B., Zhao X., Zheng L., Zhang J., Li N., Inoue T.* Aggregation behavior of long-chain imidazolium ionic liquids in aqueous solution: Micellization and characterization of micelle microenvironment // *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects* 2008 V. 317 P. 666.

21. *Snyder L.R., Dolan J.W.* Initial experiments in high-performance liquid chromatographic method development I. Use of a starting gradient run // *J. Chromatogr. A* 1996 V. 721 P. 3.

22. *Krass J.D., Jastorff B., Genieser H.G.* Determination of Lipophilicity by Gradient Elution High-Performance Liquid Chromatography // *Anal. Chem.* 1997 V. 69 P. 2575.

23. *Valko K., Bevan C., Reynolds D.* Chromatographic Hydrophobicity Index by Fast-Gradient RP-HPLC: A High-Throughput Alternative to log P/log D// *Anal. Chem.* 1997 V. 69 P. 2022.

24. *Ranke J., Stock F., Müller A., S. Stolte, R. Störmann, U. Bottin-Weber, B. Jastorff* Lipophilicity parameters for ionic liquid cations and their correlation to in vitro cytotoxicity// *Ecotoxicol. Environ. Safety* 2007 V. 67 P. 430.

25. *Claessens H.A.* Trends and progress in the characterization of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography // *Trends Anal. Chem.* 2001. V. 20. P. 563.

26. *Reta M., Carr P.W.* Comparative study of divalent metals and amines as silanol-blocking agents in reversed-phase liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 1999. V. 855. P. 121.

27. *Righetti P.G., Gelfi C., Verzola B., Castelletti L.* The state of the art of dynamic coatings // *Electrophoresis.* 2001. V. 22. P. 603.

28. *Jiang Q., Qiu H., Wang X., Liu X., Zhang S.* Effect of Ionic Liquids as Additives on the Separation of Bases and Amino Acids in HPLC // *J. Liq. Chromatogr. Rel.*

Technol. 2008. V. 31. P. 1448.

29. *Marszałł M.P., Baczek T., Kaliszan R.* Evaluation of the silanol-suppressing potency of ionic liquids // J. Sep. Sci. 2006. V. 29. P. 1138.

30. *Kaliszan R., Marszałł M.P., Markuszewski M.J., Baczek T., Pernak J.* Suppression of deleterious effects of free silanols in liquid chromatography by imidazolium tetrafluoroborate ionic liquids // J. Chromatogr. A. 2004. V. 1030. P. 263.

31. *Petruczyński A.* Effect of Ionic Liquid Additives to Mobile Phase on Separation and System Efficiency for HPLC of Selected Alkaloids on Different Stationary Phases // J. Chromatogr. Sci. 2012 V. 50 P. 287.

32. *Bian M., Zhang Z., Yin H.* Effects and mechanism characterization of ionic liquids as mobile phase additives for the separation of matrine-type alkaloids by liquid chromatography// J. Pharm. Biomed. Anal. 2012 V. 58 P. 163.

33. *Flieger J., Czajkowska-Zelazko A.* Comparison of chaotropic salt and ionic liquid as mobile phase additives in reversed-phase high-performance liquid chromatography of biogenic amines// J. Sep. Sci. 2011 V. 34 P. 733.

34. *Zhang W.Z., L.J. He, Y.L. Gu, X. Liu, S. Jiang* Effect of Ionic Liquids as Mobile Phase Additives on Retention of Catecholamines in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography // Anal. Lett. 2003 V. 36 P. 827.

35. *Marszałł M.P., Baczek T., Kaliszan R.* Reduction of silanophilic interactions in liquid chromatography with the use of ionic liquids // Anal. Chim. Acta 2005 V. 547 P. 172.

36. *Xiahou X., Liang Z., Xia L., Shengxiang J.* Ionic liquids as additives in high performance liquid chromatography: Analysis of amines and the interaction mechanism of ionic liquids// Anal. Chim. Acta 2004 V. 519 P. 207.

37. *Herrera-Herrera A.V., Hernández-Borges J., Rodríguez-Delgado M.A.* Ionic liquids as mobile phase additives for the high-performance liquid chromatographic

analysis of fluoroquinolone antibiotics in water samples // *Anal. Bioanal. Chem.* 2008 V. 392 P. 1439.

38. *Han D., Wang Y., Jin Y., Row K.H.* Analysis of Some β -Lactam Antibiotics Using Ionic Liquids as Mobile Phase Additives by RP-HPLC // *J. Chromatogr. Sci.* 2011 V. 49 P. 63.

39. *Cruz-Vera M., Lucena R., Cárdenas S., Valcárcel M.* Combined use of carbon nanotubes and ionic liquid to improve the determination of antidepressants in urine samples by liquid chromatography// *Anal. Bioanal. Chem.* 2008 V. 391 P. 1139.

40. *Rao R.N., Ramachandra B., Vali R.M.* Reversed-phase liquid chromatographic separation of antiretroviral drugs on a monolithic column using ionic liquids as mobile phase additives // *J. Sep. Sci.* 2011 V. 34 P. 500.

41. *Ruiz-Angel M.J., Carda-Broch S., Berthod A.* Ionic liquids versus triethylamine as mobile phase additives in the analysis of β -blockers // *J. Chromatogr. A* 2006 V. 1119 P. 202.

42. *Fernández-Navarro J.J., García-Alvarez-Coque M.C., Ruiz-Angel M.J.* The role of the dual nature of ionic liquids in the reversed-phase liquid chromatographic separation of basic drugs// *J. Chromatogr. A* 2011 V. 1218 P. 398.

43. *Fernández-Navarro J.R., Torres-Lapasió J.R., Ruiz-Angel M.J., García-Alvarez-Coque M.C.* Silanol suppressing potency of alkyl-imidazolium ionic liquids on C18 stationary phases // *J. Chromatogr. A* 2012 V. 1232 P. 166.

44. *Fernández-Navarro J.R., Torres-Lapasió J.R., Ruiz-Angel M.J., García-Alvarez-Coque M.C.* 1-Hexyl-3-methyl imidazolium tetrafluoroborate: An efficient column enhancer for the separation of basic drugs by reversed-phase liquid chromatography// *J. Chromatogr. A* 2012 V. 1258 P. 168.

45. *Ubeda-Torres M.T., Ortiz-Bolsico C., García-Alvarez-Coque M.C., Ruiz-Angel M.J.* Gaining insight in the behaviour of imidazolium-based ionic liquids as additives

in reversed-phase liquid chromatography for the analysis of basic compounds // J. Chromatogr. A 2015 V. 1380 P. 96.

46. *Martín-Calero A., Pino V., Ayala J.H., González V., Afonso A.M.* Ionic liquids as mobile phase additives in high-performance liquid chromatography with electrochemical detection: Application to the determination of heterocyclic aromatic amines in meat-based infant foods// *Talanta* 2009 V. 79 P. 590.

47. *Martín-Calero A., Ayala J.H., González V., Afonso A.M.* Ionic liquids as desorption solvents and memory effect suppressors in heterocyclic aromatic amines determination by SPME–HPLC fluorescence // *Anal. Bioanal. Chem.* 2009 V. 394 P. 937.

48. *Martín-Calero A., Tejral G., Ayala J.H., González V., Afonso A.M.* Suitability of ionic liquids as mobile-phase additives in HPLC with fluorescence and UV detection for the determination of heterocyclic aromatic amines// *J. Sep. Sci.* 2010 V. 33 P. 182.

49. *Zhou L., Danielson N.D.* The ionic liquid isopropylammonium formate as a mobile phase modifier to improve protein stability during reversed phase liquid chromatography // *J. Chromatogr. B* 2013 V. 940 P. 112.

50. *García-Alvarez-Coque M.C., Ruiz-Angel M.J., Berthod A., Carda-Broch S.* On the use of ionic liquids as mobile phase additives in high-performance liquid chromatography. A review // *Anal. Chim. Acta.* 2015. V. 883. P. 1.

51. *He L., Zhang W., Zhao L., Liu X., Jiang Sh.* Effect of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids as the eluent on the separation of ephedrine by liquid chromatography// *J. Chrom. A* 2003 V. 1007 P.39

52. *Kazakevich Y.V.* High-performance liquid chromatography retention mechanisms and their mathematical descriptions // *J. Chromatogr. A.* 2006. V. 1126. P. 232.

53. *Polyakova Y., Row K.H.* Retention Behaviour Of N-Cbz-D-Phenylalanine And D-Tryptophan: Effect Of Ionic Liquid As Mobile-Phase Modifier// *Acta Chromatogr.*

2006. V. 17. P. 210.

54. Xiao X., Zhao L., Liu X., Jiang S. Ionic liquids as additives in high performance liquid chromatography: Analysis of amines and the interaction mechanism of ionic liquids // *Anal. Chim. Acta*. 2004. V. 519. P. 207.

55. *Chul-Woong C., Jungnickel C., Stolte S., Preiss U., Arning J., Ranke J.* Determination of LFER Descriptors of 30 Cations of Ionic Liquids – Progress in Understanding Their Molecular Interaction Potentials // *Chem. Phys. Chem*. 2012. V. 13. P. 780.

56. *Jin C.H., Koo Y.M., Choi D., Row K.H.* Effect of mobile phase additives on resolution of some nucleic compounds in high performance liquid chromatography// *Biotechnol. Bioprocess Engineering*. 2007. V. 12. P. 525.

57. *Hua J.C., Polyakova Y., Row K.H.* Effect of Concentration of Ionic Liquids on Resolution of Nucleotides in Reversed-phase Liquid Chromatography // *Bull. Korean Chem. Soc*. 2007. V. 28. P. 601.

58. *Yu H., Sun Y.-M., Zou Ch.-M.* Imidazolium ionic liquid as the background ultraviolet absorption reagent for determination of morpholinium cations by high performance liquid chromatography-indirect ultraviolet detection // *Chin. Chem. Lett*. 2014. V. 25. P. 1371.

59. *Liu Y.-q., Yu H.* Ion chromatography with the indirect ultraviolet detection of alkali metal ions and ammonium using imidazolium ionic liquid as ultraviolet absorption reagent and eluent // *J. Sep. Sci*. 2016 V. 39 P. 3156

60. Zhang Y., Yu H., Wang M. Determination of pyrrolidinium ionic liquid cations by ion chromatography-indirect ultraviolet detection with imidazolium ionic liquids as both an ultraviolet absorption reagent and an eluting agent // *Anal. Methods* 2015 V. 7 P. 5654

61. *Huang Y., Yao S., Song H.* Application of Ionic Liquids in Liquid

Chromatography and Electrodriven Separation // J. Chromatogr. Sci. 2013. V. 51 P. 739.

62. *Zhang M., Liang X., Jiang S., Qiu H.* Preparation and applications of surface-confined ionic-liquid stationary phases for liquid chromatography // Trends Anal. Chem. 2014 V. 53 P. 60.

63. *Qiu H., Mallik A.K., Sawada T., Takafujia M., Ihara H.* New surface-confined ionic liquid stationary phases with enhanced chromatographic selectivity and stability by co-immobilization of polymerizable anion and cation pairs // Chem. Commun. 2012 V. 48 P. 1299.

64. *Qiu H., Jiang S., Takafuji M., Ihara H.* Polyanionic and polyzwitterionic azobenzeneionic liquid-functionalized silica materials and their chromatographic applications // Chem. Commun. 2013 V. 49 P. 2454.

65. *Qiao L., Dou A., Shi X., Li H., Shan Y., Lu X., Xu G.* Development and evaluation of new imidazolium-based zwitterionic stationary phases for hydrophilic interaction chromatography // J. Chromatogr. A 2013 V. 1286 P. 137.

66. *Qiao X., Zhang L., Zhang N., Wang X., Qin X., Yan H., Liu H.* Imidazolium embedded C8 based stationary phase for simultaneous reversed-phase/hydrophilic interaction mixed-mode chromatography // J. Chromatogr. A 2015 V. 1400 P. 107.

67. *Zhang M., Chen J., Gu T., Qiu H., Jiang S.* Novel imidazolium-embedded and imidazolium-spaced octadecyl stationary phases for reversed phase liquid chromatography // Talanta 2014 V. 126 P. 177.

68. *Liu H., Guo Y., Wang X., Liang X., Liu X.* Amino-terminated ionic liquid modified graphene oxide coated silica composite stationary phase for hydrophilic interaction chromatography // RSC Adv. 2014 V. 4 P. 37381

69. *Zhang M., Chen J., Qiu H., Mallik A.K., Takafuji M., Ihara H.* Homogenous formation and quaternization of urea-functionalized imidazolyl silane and its

immobilization on silica for surface-confined ionic liquid stationary phases // RSC Adv. 2014 V. 4 P. 34654

70. *Sun M., Feng J., Wang X., Duan H., Li L., Luo C.* Dicationic imidazolium ionicliquid modified silica as a novel reversed-phase/anion-exchange mixed-mode stationary phase for high-performance liquid chromatography // J. Sep. Sci. 2014 V. 37 P. 2153.

71. *Qiao L., Li H., Shan Y., Wang S., Shi X., Lu X., Xu G.* Study of surface-bonded dicationic ionic liquids as stationary phases for hydrophilic interaction chromatography // J. Chromatogr. A 2014 V. 1330 P. 40

72. *Qiao L., Shi X., Lu X., Xu G.* Preparation and evaluation of surface-bonded tricationic ionic liquid silica as stationary phases for high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. A 2015 V. 1396 P. 62

73. *Hu K., Zhang W., Yang H., Cui Y., Zhang J., Zhao W., Yu A., Zhang Sh.* Calixarene ionic liquid modified silica gel: A novel stationary phase for mixed-mode chromatography// Talanta 2016 V. 152 P. 392

74. *Qiu H., Mallik A.K., Takafuji M., Ihara H.* A Facile and Specific Approach to New Liquid Chromatography Adsorbents Obtained by Ionic Self-Assembly // Chem. Eur. J. 2011 V. 17 P. 7288.

75. *Qiu H., Mallik A.K., Takafuji M., Liu X., Jiang S., Ihara H.* Enhancement of molecular shape selectivity by in situ anion-exchange in poly(octadecylimidazolium) silica column // J Chromatogr. A 2012 V. 1232 P. 116

76. *Qiu H., Mallik A.K., Takafuji M., Jiang S., Ihara H.* New poly(ionic liquid)-grafted silica multi-mode stationary phase for anion exchange/reversed-phase/hydrophilic interaction liquid chromatography // Analyst 2012 V. 137 P. 2553.

77. *Zhang P., Chen J., Jia L.* N-Methylimidazolium-functionalized monolithic silica column for mixed-mode chromatography // J. Chromatogr. A 2011 V. 1218 P. 3459

78. *H. Han, J. Li, X. Wang, X. Liu, S. Jiang.* Synthesis of ionic liquid-bonded organic-silica hybrid monolithic column for capillary electrochromatography // *J. Sep.Sci.* 2011 V. 34 P. 2323
79. *Han H., Wang Q., Liu X., Jiang S.* Polymeric ionic liquid modified organic-silica hybrid monolithic column for capillary electrochromatography // *J. Chromatogr. A* 2012 V. 1246 P. 9
80. *Wang J., Wu F., Xia R., Zhao Q., Lin X., Xie Z.* Rapid fabrication of ionic liquid-functionalized monolithic column via in-situ urea-formaldehyde polycondensation for pressurized capillary electrochromatography // *J. Chromatogr. A*, 2016 V. 1449 P. 100
81. *Shan Y., Qiao L., Shi X., Xu G.* Preparation and evaluation of a novel hybridmonolithic column based on pentafluorobenzyl imidazolium bromide ionic liquid // *J. Chromatogr. A* 2015 V. 1375 P. 101.
82. *Pino V., Afonso A. M.* Surface-bonded ionic liquid stationary phases in high-performance liquid chromatography—A review // *Anal. Chim. Acta* 2012 V. 714 P. 20
83. *Shi X., Qiao L., Xu G.* Recent development of ionic liquid stationary phases for liquid chromatography // *J. Chromatogr. A* 2015 V. 1420 P. 1
84. *Yanes E.G., Gratz S.R., Stalcup A.M* Tetraethylammonium tetrafluoroborate: a novel electrolyte with a unique role in the capillary electrophoretic separation of polyphenols found in grape seed extracts // *Analyst* 2000 V. 125 P. 1919
85. *Yanes E.G., Gratz S.R., Baldwin M.J., Robison S.E., Stalcup A.M.* Capillary Electrophoretic Application of 1-Alkyl-3-methylimidazolium-Based Ionic Liquids // *Anal. Chem.* 2001 V. 73 P. 3838
86. *Li L., Du H., Yu H., Xu L., You T.* Application of ionic liquid as additive in determination of three β -agonists by capillary electrophoresis with amperometric detection // *Electrophoresis* 2013 V. 34 P. 277.

87. *Lu Y., Jia C., Yao Q., Zhong H., Breadmore M.C.* Analysis of flavonoids by non-aqueous capillary electrophoresis with 1-ethyl-3-methylimidazolium ionic-liquids as background electrolytes // *J. Chromatogr. A* 2013 V. 1319 P. 160
88. *Xiao W., Wang F.-Q., Li C.-H., Zhang Q., Xia Z.-N., Yang F.-Q.* Determination of eight isoflavones in *Radix Puerariae* by capillary zone electrophoresis with an ionic liquid as an additive // *Anal. Methods* 2015 V. 7 P. 1098
89. *Vaher M., Koel M.* Specific background electrolytes for nonaqueous capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. A* 2005 V. 1068 P. 83
90. *Kenndler E.* A critical overview of non-aqueous capillary electrophoresis. Part I: Mobility and separation selectivity// *J. Chromatogr. A* 2014 V. 1335 P. 16
91. *Scriba G.K.E.* Nonaqueous capillary electrophoresis–mass spectrometry // *J. Chromatogr. A* 2007 V. 1159 P.28
92. *Vaher M., Koel M., Kaljurand M.* Non-aqueous capillary electrophoresis in acetonitrile using ionic-liquid buffer electrolytes *Chromatographia* 2000 V. 53(1) P. S302.
93. *Seiman A., Vaher M., Kaljurand M.* Monitoring of the electroosmotic flow of ionic liquid solutions in non-aqueous media using thermal marks// *J. Chromatogr. A* 2008 V. 1189 P. 266.
94. *Lu Y., Wang D., Kong C., Zhong H., Breadmore M.C.* Analysis of aromatic acids by nonaqueous capillary electrophoresis with ionic-liquid electrolytes // *Electrophoresis* 2014 V. 35 P. 3310
95. *Vaher M., Koel M., Kaljurand M.* Ionic liquids as electrolytes for nonaqueous capillary electrophoresis // *Electrophoresis* 2002.V. 23 P. 426.
96. *Lu Y., Jia C., Yao Q., Zhong H., Breadmore M.C.* Analysis of flavonoids by non-aqueous capillary electrophoresis with 1-ethyl-3-methylimidazolium ionic-liquids as background electrolytes // *J. Chromatogr. A* 2013 V. 1319 P. 160.

97. *Qin W., Li S.F.Y.* Electrophoresis of DNA in ionic liquid coated capillary// *Analyst*. 2003. V. 128. P. 37.
98. *Qin W., Li S.F.Y.* An ionic liquid coating for determination of sildenafil and UK-103,320 in human serum by capillary zone electrophoresis-ion trap mass spectrometry// *Electrophoresis*. 2002. V. 23. P. 4110.
99. *Qin W., Wei H., Li S.F.Y.* 1, 3-Dialkylimidazolium-based room-temperature ionic liquids as background electrolyte and coating material in aqueous capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. A*. 2003. V. 985. P. 447.
100. *Borissova M., Vahe M., Koel M., Kaljurand M.* Capillary zone electrophoresis on chemically bonded imidazolium based salts // *J. Chromatogr. A*. 2007. V. 1160. P. 320.
101. *Terabe S.* Capillary Separation: Micellar Electrokinetic Chromatography // *Ann. Rev. Anal. Chem.* 2009 V. 2 P. 99.
102. *Seifar R.M., Kraak J.C., Kok W.T.* Mechanism of Electrokinetic Separations of Hydrophobic Compounds with Sodium Dodecyl Sulfate in Acetonitrile–Water Mixtures // *Anal. Chem.* 1997 V. 69 P. 2772.
103. *Shuhui L., Xuan T., Xingguo C., Zhide H.* // *Chromatographia* 2002 V. 56 P. 687.
104. *Katsuta S., Saitoh K.* Control of separation selectivity in micellar electrokinetic chromatography by modification of the micellar phase with solubilized organic compounds // *J. Chromatogr. A*. 1997 V. 780 P. 165.
105. *Ishihama Y., Nishi H., Fukuyama T., Otsuka K.* Effect of urea addition in micellar electrokinetic chromatography // *J. Chromatogr. A*. 1991 V. 545 P. 359.
106. *Terabe S., Miyashita Y., Shibata O., Barnhart E.R., Alexander L.R., Patterson D.G.* Separation of highly hydrophobic compounds by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography // *J. Chromatogr. A* 1990 V. 516 P. 23.

107. *Copper C.L., Sepaniak M.J.* Cyclodextrin-modified micellar electrokinetic capillary chromatography separations of benzopyrene isomers: correlation with computationally derived host-guest energies // *Anal. Chem.* 1994 V. 66. P. 147.
108. *Liu G., Chen J., Ma Y.* Simultaneous determination of catecholamines and polyamines in PC-12 cell extracts by micellar electrokinetic capillary chromatography with ultraviolet absorbance detection // *J. Chromatogr. B* 2004 V. 805. P. 281.
109. *Nishi H., Tsumagari N., Terabe S.* Effect of tetraalkylammonium salts on micellar electrokinetic chromatography of ionic substances // *Anal. Chem.* 1989 V. 61 P. 2434.
110. *Kaneta T., Tanaka S., Taga M., Yoshida H.* Effect of addition of glucose on micellar electrokinetic capillary chromatography with sodium dodecyl sulphate // *J. Chromatogr. A* 1992 V. 609 P. 369.
111. *Akbay C., Gill N.L., Agbaria R.A., Warner I.M., C. Akbay.* Polymeric Sulfated Surfactants With Varied Hydrocarbon Tail: I. Synthesis, Characterization, and Application in Micellar Electrokinetic Chromatography // *Electrophoresis* 2003 V. 24 P. 4209.
112. *Wu L.C, Hu C.Y., Dung Y.S., Wu T.H.* In-capillary formation of polymer/surfactant complexes–assisted reversed-migration micellar electrokinetic chromatography for facile analysis of neutral steroids // *Talanta* 2013 V. 107 P. 389.
113. *Shpak A.V., Pirogov A.V., Shpigun O.A.* Micellar electrokinetic chromatography with polyelectrolyte complexes as micellar pseudo-stationary phases // *J. Chromatogr. B* 2004 V. 800 P. 91.
114. *Quirino J. P., Anres P., Sirieix- Plenet J., Delaunay N., Gareil P.* Potential of long chain ionic liquids for on-line sample concentration techniques: Application to micelle to solvent stacking // *J. Chromatogr. A* 2011 V. 1218 P. 5718.
115. *Wang Q., Qiu H., Han H., Liu X., Jiang S.* Two-step stacking by sweeping and

micelle to solvent stacking using a long-chain cationic ionic liquid surfactant// J. Sep. Sci. 2012 V. 35 P. 589.

116. Wang Z.F., Cheng S., Ge S.L., Wang H., Wang Q.J., He P.G., Fang Y.Z. Ultrasensitive Detection of Bacteria by Microchip Electrophoresis Based on Multiple-Concentration Approaches Combining Chitosan Sweeping, Field-Amplified Sample Stacking, and Reversed-Field Stacking // Anal. Chem. 2012 V. 84 P. 1687.

117. Jungnickel C., Luczak J., Ranke J., Fernandez J., Muller A., Thoming J. Micelle formation of imidazolium ionic liquids in aqueous solution // Colloids and Surfaces A 2008 V. 316 P. 278.

118. Lokajová J., Railila A., King A.W., Wiedmer S.K. Determination of the distribution constants of aromatic compounds and steroids in biphasic micellar phosphonium ionic liquid/aqueous buffer systems by capillary electrokinetic chromatography // J. Chromatogr. A 2013 V. 1308 P. 144.

119. Rageh A. H., Pyell U. Imidazolium-based ionic liquid-type surfactant as pseudostationary phase in micellar electrokinetic chromatography of highly hydrophilic urinary nucleosides// J. Chromatogr. A 2013 V. 1316 P. 135.

120. Su H.-L., Kao W.-C., Lin K.-W., Lee C., Hsieh Y.-Z. 1-Butyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids and an anionic surfactant: Excellent background electrolyte modifiers for the analysis of benzodiazepines through capillary electrophoresis // J. Chromatogr. A 2010 V. 1217 P. 2973.

121. Bessonova E. A., Kartsova L. A., Gallyamova V. F. Effect of 3-methyl-1-cetylimidazolium chloride ionic liquid on the electrophoretic preconcentration of steroid hormones// J. Anal. Chem. 2016 V. 71 P. 696.

122. Quirino J.P., Anres P., Sirieix-Plénet J., Delaunay N., Gareil P. Potential of long chain ionic liquids for on-line sample concentration techniques: Application to micelle to solvent stacking // J. Chromatogr. A 2011 V. 1218 P. 5718.

123. *Su H.-L., Lan M.-T., Hsieh Y.-Z.* Using the cationic surfactants N-cetyl-N-methylpyrrolidinium bromide and 1-cetyl-3-methylimidazolium bromide for sweeping–micellar electrokinetic chromatography// *J. Chromatogr. A* 2009 V. 1216 P. 5313.
124. *El-Hady D.A., Albishri H.M.* Alkyl imidazolium ionic liquid based sweeping-micellar electrokinetic chromatography for simultaneous determination of seven tea catechins in human plasma // *J. Chromatog. B* 2014 V. 969 V. 224.
125. *El-Hady D.A., Albishri H.M., Rengarajan R., Watzig H.* Use of short chain alkyl imidazolium ionic liquids for on-line stacking and sweeping of methotrexate, flinic acid and folic acid: Their application to biological fluids // *Electrophoresis* 2014 V. 35 P. 1956.
126. *Zhou Z., Li X., Chen X., Hao X.* Synthesis of ionic liquids functionalized β -cyclodextrin-bonded chiral stationary phases and their applications in high-performance liquid chromatography // *Anal. Chim. Acta* 2010 V. 678 P. 208.
127. *Kodali P., Stalcup A.M.* Normal Phase Chiral Separation Of Hexahelicene Isomers Using A Chiral Surface Confined Ionic Liquid Stationary Phase // *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 2014. V. 37. P. 893.
128. *Wang T., Yang H., Qiu R., Huang Sh.* Synthesis of novel chiral imidazolium stationary phases and their enantioseparation evaluation by high-performance liquid chromatography // *Analytica Chimica Acta* 2016 V. 944 P. 70.
129. *Liu Q., Wu K., Tang F., Yao L., Yang F., Nie Z., Yao S.* Amino Acid Ionic Liquids as Chiral Ligands in Ligand-Exchange Chiral Separations // *Chem. Eur. J.* 2009. V. 15. P. 9889.
130. *Yang Y.X., Li J., Jiang X.Y.* Chiral ionic liquids as chiral selectors for separation of tryptophan enantiomers by ligand exchange chromatography // *J. Cent. South Univ.* 2013. V. 20. P. 1173.

131. *Qing H., Jiang X., Yu J.* Separation of Tryptophan Enantiomers by Ligand-Exchange Chromatography With Novel Chiral Ionic Liquids Ligand // *Chirality*. 2014. V. 26. P. 160.
132. *Mu X., Qi L., Shen Y., Zhang H., Qiao J., Ma H.* A novel chiral ligand exchange capillary electrophoresis system with amino acid ionic liquid as ligand and its application in screening D-amino-acid oxidase inhibitors // *Analyst* 2012 V. 137 P. 4235.
133. *Cui Y., Ma X., Zhao M., Jiang Z., Xu S., Guo X.* Combined Use of Ionic Liquid and Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin for the Enantioseparation of Ten Drugs by Capillary Electrophoresis // *Chirality* 2013 V. 25 P. 409.
134. *Sun P., Armstrong D.W.* Ionic liquids in analytical chemistry // *Anal. Chim. Acta* 2010 V. 661 P. 1.
135. *Vaher M., Borissova M., Koel M., Kaljurand M.* Ionic liquids as background electrolyte additives and coating materials in capillary electrophoresis // *Proc. Estonian Acad. Sci. Chem.* 2007 V. 56 (4) P. 187.
136. *Kapnissi-Christodoulou C., Stavrou I.J., Mavroudi M.C.* Chiral ionic liquids in chromatographic and electrophoretic separations // *J. Chromatogr. A* 2014 V. 1363 P. 2.
137. *Карцова Л.А., Бессонова Е.А., Колобова Е.А.* Ионные жидкости – модификаторы хроматографических и электрофоретических систем // *Журнал аналитической химии*, 2016, Т. 71 № 2 С. 147.
138. *Absalan G., Akhond M., Sheikhian L.* Extraction and high performance liquid chromatographic determination of 3-indole butyric acid in pea plants by using imidazolium-based ionic liquids as extractant // *Talanta* 2008 V. 77 P. 407.
139. *Matsumoto M., Mochiduki K., Fukunishi K., Kondo K.* Extraction of organic acids using imidazolium-based ionic liquids and their toxicity to *Lactobacillus*

rhamnosus // Sep. Purif. Technol. 2004 V. 40 P. 97.

140. *Khachatryan K.S., Smirnova S.V., Torocheshnikova I.I., Shvedene N.V., Formanovsky A.A., Pletnev I.V.* Solvent extraction and extraction–voltammetric determination of phenols using room temperature ionic liquid// Anal. Bioanal. Chem. 2005 V. 381 P. 464.

141. *Vidal S.T.M., Correia M.J.N., Marques M.M., Ismael M.R., Reis M.T.A.* Studies on the Use of Ionic Liquids as Potential Extractants of Phenolic Compounds and Metal Ions // Sep. Sci. Technol. 2004 V. 39 P. 2155.

142. *Smirnova S.V., Torocheshnikova I.I., Formanovsky A.A., Pletnev I.V.* Solvent extraction of amino acids into a room temperature ionic liquid with dicyclohexano-18-crown-6 // Anal. Bioanal. Chem. 2004 V. 378 P. 1369.

143. *Wang J., Pei Y., Zhao Y., Hu Z.* Recovery of amino acids by imidazolium based ionic liquids from aqueous media // Green Chem. 2005 V. 7 P. 196.

144. *Shah S.N., Chellappan L.K., Gonfa G., Mutalib M.I.A., Pilus R.B.M., Bustam M.A.* Extraction of naphthenic acid from highly acidic oil using phenolate based ionic liquids // Chem. Engineering J. 2016 V. 284 P. 487.

145. *Fan Y., Li X., Song L., Li J., Zhang L.* Effective extraction of quinine and gramine from water by hydrophobic ionic liquids: The role of anion// Chemical engineering research and design 2017 V. 119 P. 58.

146. *Pei Y., Wang J., Wu K., Xuan X., Lu X.* Ionic liquid-based aqueous two-phase extraction of selected proteins // Sep. Purif. Technol. 2009 V. 64 P. 288.

147. *Yang X., Zhang Sh., Yu W., Liu Zh., Lei L., Li N., Zhang H., Yu Y.* Ionic liquid-anionic surfactant based aqueous two-phase extraction for determination of antibiotics in honey by high-performance liquid chromatography // Talanta 2014 V. 124 P. 1.

148. *Tian M., Yan H., Row K.H.* Solid-phase extraction of tanshinones from *Salvia Miltiorrhiza* Bunge using ionic liquid-modified silica sorbents // J. Chromatogr. B

2009 V. 877 P. 738.

149. Fang G., Chen J., Wang J., He J., Wang S. N-Methylimidazolium ionic liquid-functionalized silica as a sorbent for selective solid-phase extraction of 12 sulfonylurea herbicides in environmental water and soil samples // *J. Chromatogr. A* 2010 V. 1217 P. 1567.

150. Bi W., Zhou J., Row K.H. Solid phase extraction of lactic acid from fermentation broth by anion-exchangeable silica confined ionic liquids // *Talanta* 2011 V. 83 P. 974.

151. Vidal L., Parshintsev J., Hartonen K., Canals A., Riekkola M.-L. Ionic liquid-functionalized silica for selective solid-phase extraction of organic acids, amines and aldehydes // *J Chromatogr A*. 2012 V. 1226 P. 2.

152. Li M., Pham P.J., Wang T., Pittman Jr. C.U., Li T. Solid phase extraction and enrichment of essential fatty acid methyl esters from soy-derived biodiesel by novel π -complexing sorbents // *Bioresour. Technol.* 2009 V. 100 P. 6385.

153. Li M., Pham P.J., Wang T., Pittman Jr. C.U., Li T. Selective extraction and enrichment of polyunsaturated fatty acid methyl esters from fish oil by novel π -complexing sorbents // *Sep. Purif. Technol.* 2009 V. 66 P. 1.

154. Tian M., Yan H., Row K.H. Solid-Phase Extraction of Caffeine and Theophylline from Green Tea by a New Ionic Liquid-Modified Functional Polymer Sorbent // *Anal. Lett.* 2010 V. 43 P. 110.

155. Ruiz-Palomero C., Soriano M.L., Valcarce M. Ternary composites of nanocellulose, carbonanotubes and ionic liquids as new extractants for direct immersion single drop microextraction // *Talanta* 2014 V. 125 P. 72.

156. Yang J., Wei H., Teng X., Zhang H., Shi Y. Dynamic Ultrasonic Nebulisation Extraction Coupled with Headspace Ionic Liquid-based Single-drop Microextraction for the Analysis of the Essential Oil in *Forsythia suspensa*// *Phytochem. Anal.* 2014

V. 25 P. 178.

157. *Mokhtar S.U., Chin S., Vijayaraghavan R., Macfarlane D.R., Drummer O.H., Marriott P.J.* Direct ionic liquid extractant injection for volatile chemical analysis – a gas chromatography sampling technique// *Green Chem.* 2015 V. 17 P. 573.

158. *Li Z., Chen F., Wang X., Wang C.* Ionic liquids dispersive liquid –liquid microextraction and high-performance liquid chromatographic determination of irbesartan and valsartan in human urine // *Biomed. Chromatogr.* 2013 V. 27 P. 254.

159. *Xu X., Liu Z., Zhao X., Su R., Zhang Y., Shi J., Zhao Y., Wu L., Ma Q., Zhou X., Zhang H., Wang Z.* Ionic liquid-based microwave-assisted surfactant-improved dispersive liquid-liquid microextraction and derivatization of aminoglycosides in milk samples // *J. Sep. Sci.* 2013 V. 36 P. 585.

160. *Chen S., Sun Y., Chao J., Cheng L., Chen Y., Liu J.* Dispersive liquid–liquid microextraction of silver nanoparticles in water using ionic liquid 1-octyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate // *J. Environ. Sci.* 2016 V. 41 P. 211.

161. *Li G., Wang L., Fei T., Liu H., Wu D., Zheng S.* Ionic Liquid-Based Ultrasonic-Assisted Extraction Combined with HPLC–MS/MS for the Determination of Seven Mercapturic Acids in Human Urine // *Chromatographia* 2015 V. 78 P. 641.

162. *Wang L., Zhang D., Xu X., Zhang L.* Application of ionic liquid-based dispersive liquid phase microextraction for highly sensitive simultaneous determination of three endocrine disrupting compounds in food packaging // *Food Chemistry* 2016 V. 197 P. 754.

163. *De Boeck, et al.* Development and validation of a fast ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction procedure combined with LC–MS/MS analysis for the quantification of benzodiazepines and benzodiazepine-like hypnotics in whole blood // *Forensic Sci. Int.* 2017
<http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.12.026>

164. *Zhang R., Cheng X., Guo J., Zhang H., Hao X.* Comparison of Two Ionic Liquid-Based Pretreatment Methods for Three Steroids' Separation and Determination in Water Samples by HPLC // *Chromatographia* 2017 V.80 P. 237.
165. *Magiera S., Sobik A.* Ionic liquid-based ultrasound-assisted extraction coupled with liquid chromatography to determine isoflavones in soy foods // *Journal of Food Composition and Analysis* 2017 V. 57 P. 94.
166. *Ebrahimpour B., Yamini Y., Esrafil A.* Acid-induced homogenous liquid-phase microextraction: Application of medium-chain carboxylic acid as extraction phase // *J. Sep. Sci.* 2013 V. 36 P. 1493.
167. *Hosseini M.H., Rezaee M., Akbarian S., Mizani F., Pourjavid M.R., Arabieh M.* Homogeneous liquid–liquid microextraction via flotation assistance for rapid and efficient determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples // *Anal. Chim. Acta* 2013 V. 762 P. 54.
168. *Xiao Y., Zhang H.* Homogeneous ionic liquid microextraction of the active constituents from fruits of *Schisandra chinensis* and *Schisandra sphenanthera*// *Anal. Chim. Acta* 2012 V. 712 P. 78.
169. *Wang Z., He M., Jiang C., Zhang F., Du S., Feng W., Zhang H.* Matrix solid-phase dispersion coupled with homogeneous ionic liquid microextraction for the determination of sulfonamides in animal tissues using high-performance liquid chromatography // *J. Sep. Sci.* 2015 V. 38 P. 4127.
170. *Liu Zh., Yu W., Zhan H., Gu F., Jin X.* Salting-out homogenous extraction followed by ionic liquid/ionic liquid liquid–liquid micro-extraction for determination of sulfonamides in blood by high performance liquid chromatography // *Talanta* 2016 V. 161 P. 748.
171. *Han D., Row K H.* Recent Applications of Ionic Liquids in Separation Technology// *Molecules* 2010 V. 15 P. 2405.

172. *Vičkačkaitė V., Padarauskas A.* Ionic liquids in microextraction techniques // Cent. Eur. J. Chem. 2012 V. 10 (3) P. 652.
173. *Vidal L., Riekkola M.-L., Canals A.* Ionic liquid-modified materials for solid-phase extraction and separation: A review// Anal. Chim. Acta 2012 V. 715 P. 19.
174. *Trujillo-Rodriguez M.J., Rocio-Bautista Pr., Pino V., Afonso A.M.* Ionic liquids in dispersive liquid-liquid microextraction// Trends in Analytical Chemistry 2013 V. 51 P. 87.
175. *Marcinkowski Ł., Pena-Pereira Fr., Kloskowski A., Namiesnik J.* Opportunities and shortcomings of ionic liquids in single-drop microextraction // Trends in Analytical Chemistry 2015 V. 72 P. 153.
176. *Alopina E.V., Dobryakov Yu. G., Safonova E.A., Smirnova N.A.* L-Proline based alkylmethylimidazolium ionic liquids $[C_n\text{mim}][\text{L-Pro}]$: synthesis and some physicochemical properties of their aqueous solutions // Актуальные вопросы биологической физики и химии 2016 Номер 1-2 С. 173.
177. *Dobryakov, Y; Tuma, D.; Maurer, G.* Activity Coefficients at Infinite Dilution of Alkanols in the Ionic Liquids 1-Butyl-3-methylimidazolium Hexafluorophosphate, 1-Butyl-3-methylimidazolium Methyl Sulfate, and 1-Hexyl-3-methylimidazolium Bis(trifluoromethylsulfonyl) Amide Using the Dilutor Technique. // J. Chem. Eng. Data 2008 V. 53 P. 2154.
178. *Alopina E.V., E.A. Safonova, I.B. Pukinsky, N.A. Smirnova.* Liquid–Liquid Equilibria in Aqueous Mixtures of Alkylmethylimidazolium Glutamate with Potassium Carbonate and Some Physicochemical Properties of Aqueous $[C_n\text{mim}][\text{Glu}]$ ($n = 4, 6, 8$) Solutions // J. Chem. Eng. Data 2016 V. 61 P. 2013.
179. *Карцова Л.А., Бессонова Е.А., Сидорова А.А., Тверьянович И.А., Казаков В.А., Великанова Л.И.* Определение адреналина, норадреналина, дофамина

методом капиллярного электрофореза // Журнал прикл. химии 2004 т. 77. с.1164.

180. Колобова Е.А., Карцова Л.А., Бессонова Е.А. Применение ионных жидкостей на основе имидазолия при электрофоретическом определении аминокислот в моче // Журнал аналитической химии 2015 Т.70 № 11 С.1179.

181. Колобова Е.А., Карцова Л.А., Бессонова Е.А. «Ионные жидкости на основе имидазолия в качестве модификаторов электрофоретических систем при определении биогенных аминов и стероидных гормонов» // Вестник СПбГУ. Сер. 4. Т. 2. (60). 2015. Вып. 3. С.175.

182. Albers E., Müller B.W. Complexation of steroid hormones with cyclodextrin derivatives: substituent effects of the guest molecule on solubility and stability in aqueous solution // J. Pharm. Sci. 1992 V.81 P. 756.

183. Kolobova E.A., Kartsova L.A., Bessonova E.A., Alopina E.V., Safonova E.A. The possibilities of amino acid ionic liquids as a chiral selectors at separation of enantiomers of amino acids and β -blockers // Journal of Chromatography & Separation Techniques, 2016, 7:5(Suppl).

184. Fitts J.P., Persson P., Brown G.E.Jr., Parks G.A. Structure and Bonding of Cu (II)–Glutamate Complexes at the g- Al_2O_3 –Water Interface // Journal of Colloid and Interface Science 1999 V. 220 P. 133.

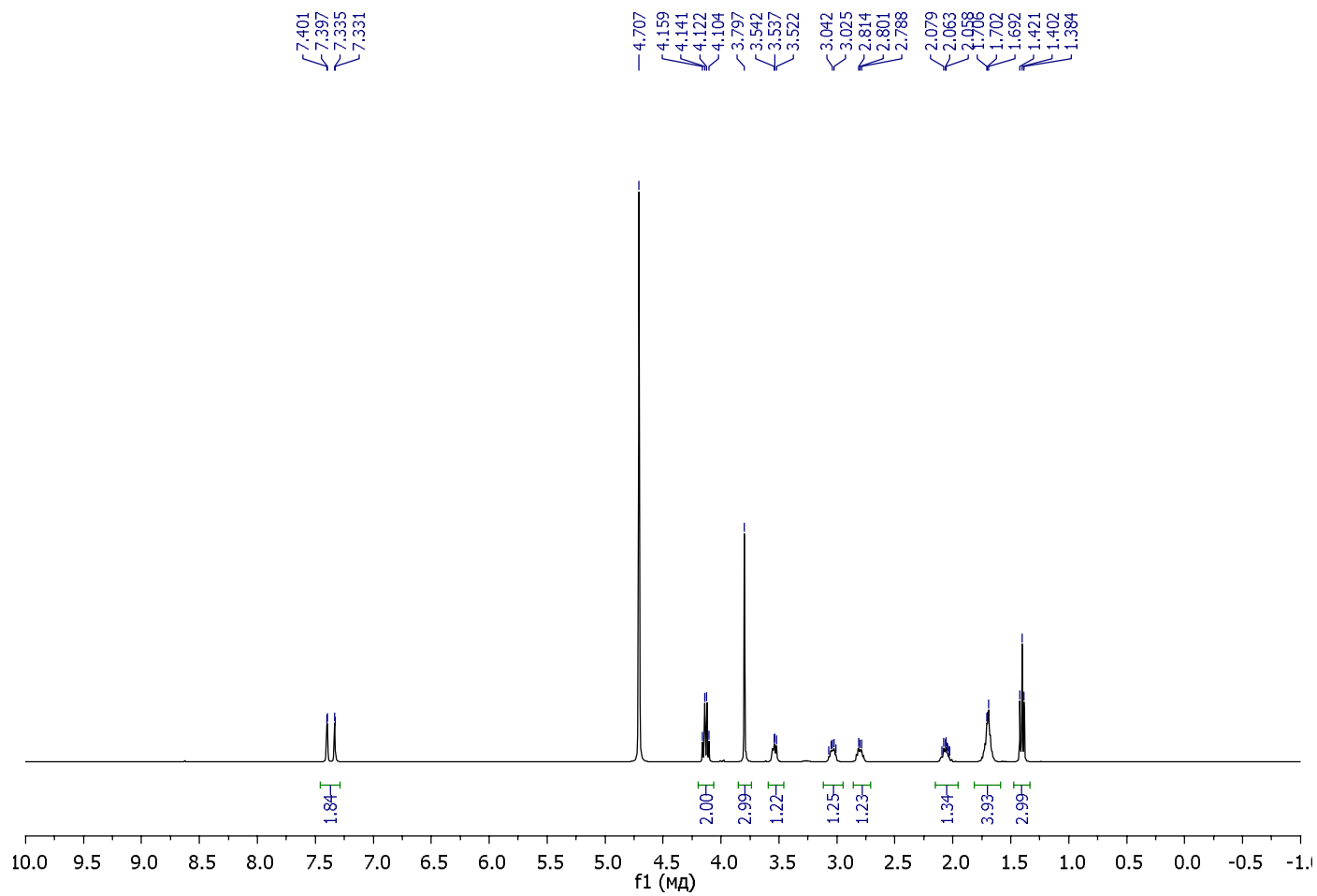
185. Schmid M.G., Lecnic O., Sitte U., Gübitz G. Application of ligand-exchange capillary electrophoresis to the chiral separation of α -hydroxy acids and β -blockers.// J. Chromatogr. A. 2000. V. 875. P. 307.

186. Карцова Л.А., Бессонова Е.А., Объедкова Е.В., Даванков В.А. Использование сверхсшитого полистирола как сорбента для твердофазной экстракции при анализе лекарств в биологических объектах методом

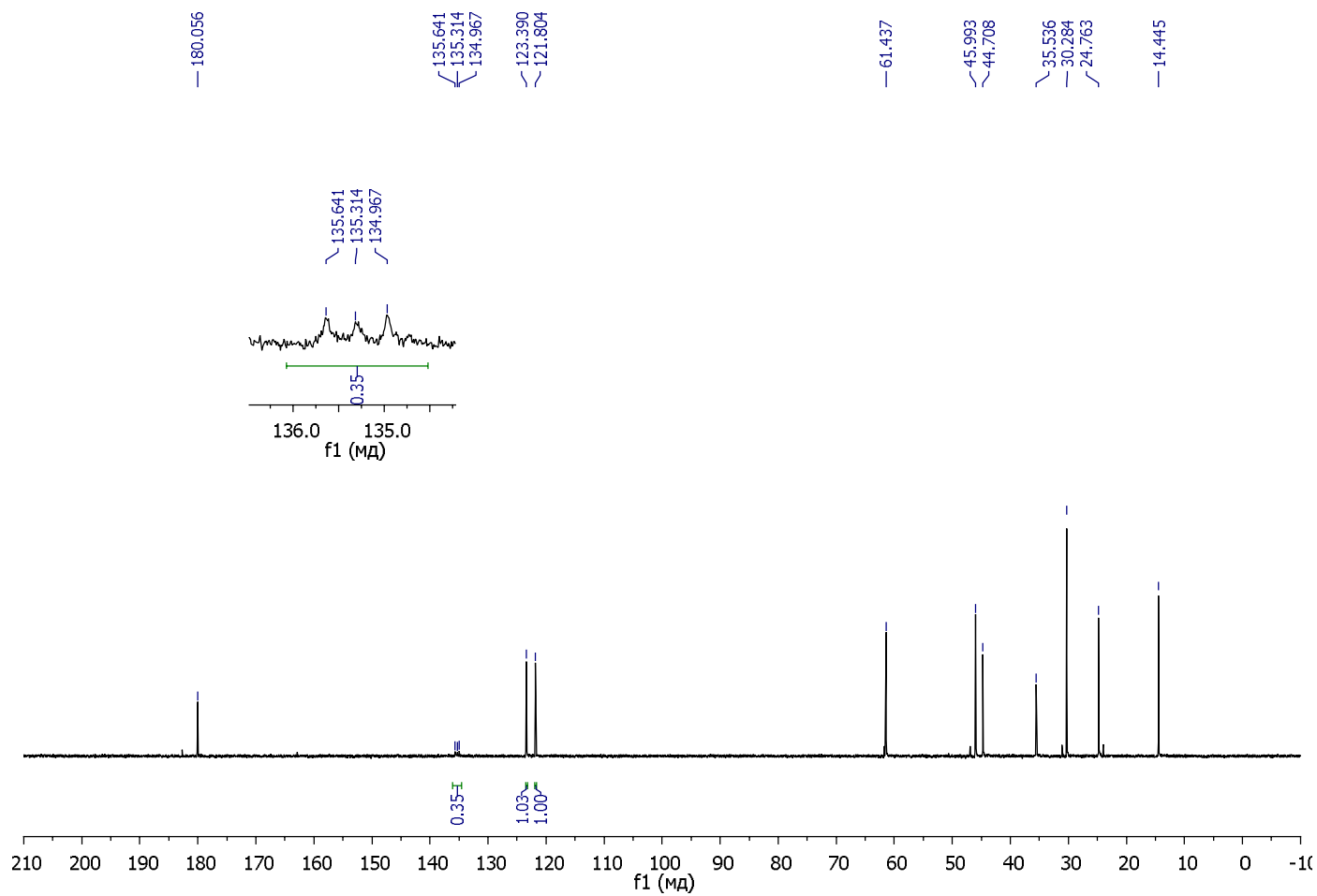
высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ)// Сорбционные и хроматографические процессы 2010 Т.10. Вып. 1 С. 5.

187. *Zhang Q., Qi X., Chunlai Feng, Tong Sh., Rui M.* Three chiral ionic liquids as additives for enantioseparation in capillary electrophoresis and their comparison with conventional modifiers // *J. Chromatogr. A* 2016 V. 1462 P. 146.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. ЯМР-спектры [C₂MIm][L-Pro] на ядрах ¹H и ¹³C.

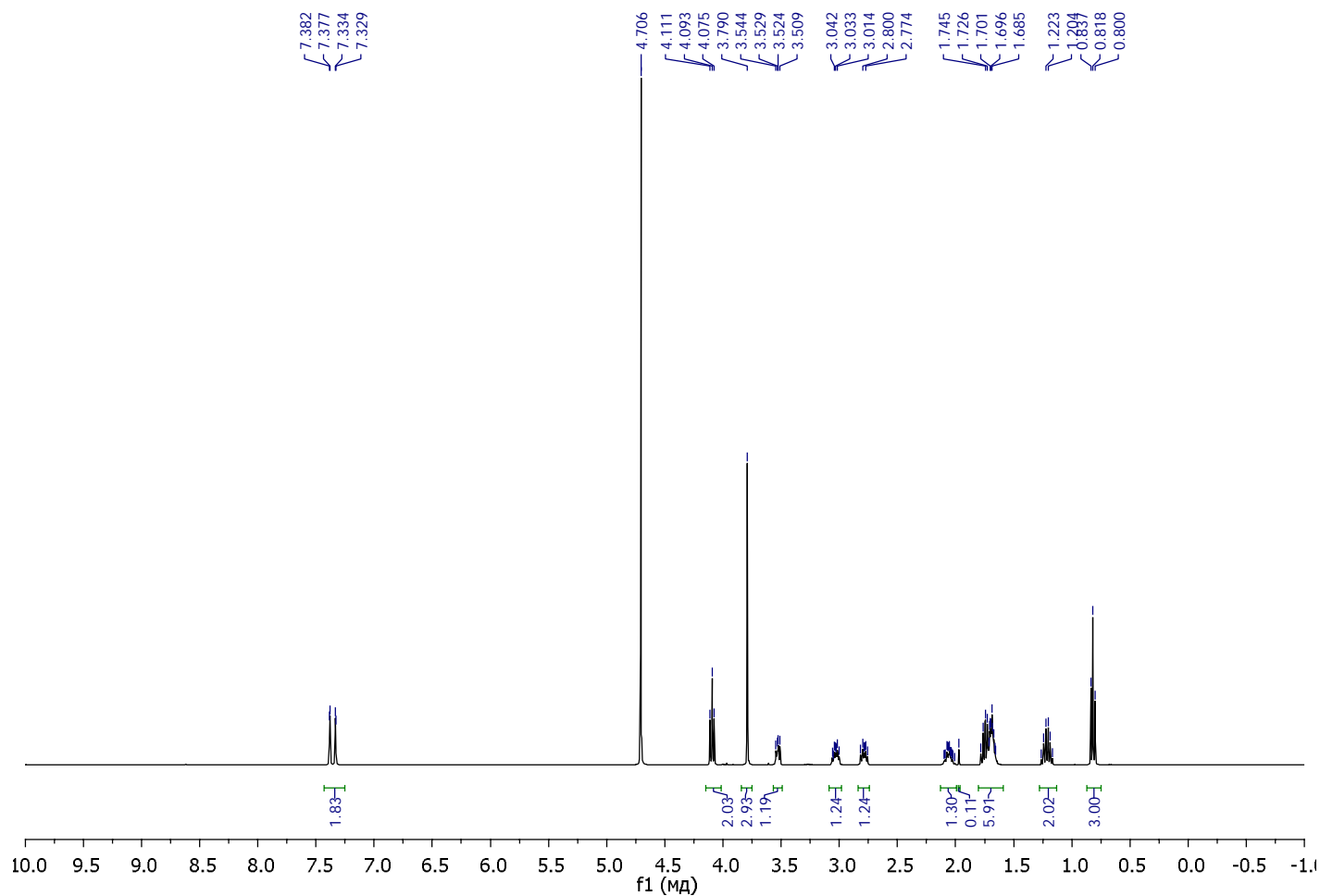


¹H ЯМР-спектр [C₂MIm][L-Pro] (400 МГц, D₂O): δ = 1.38~1.41 (t, 3H), 1.69~1.71 (m, 4H), 2.06~2.08 (m, 1H) 2.79~2.81 (m, 1H), 3.03-3.04 (m, 1H), 3.52~3.54 (m, 1H), 3.80 (s, 3H), 4.10~4.16 (t, 2H), 7.33 (d, 1H), 7.40 (d, 1H) ppm.

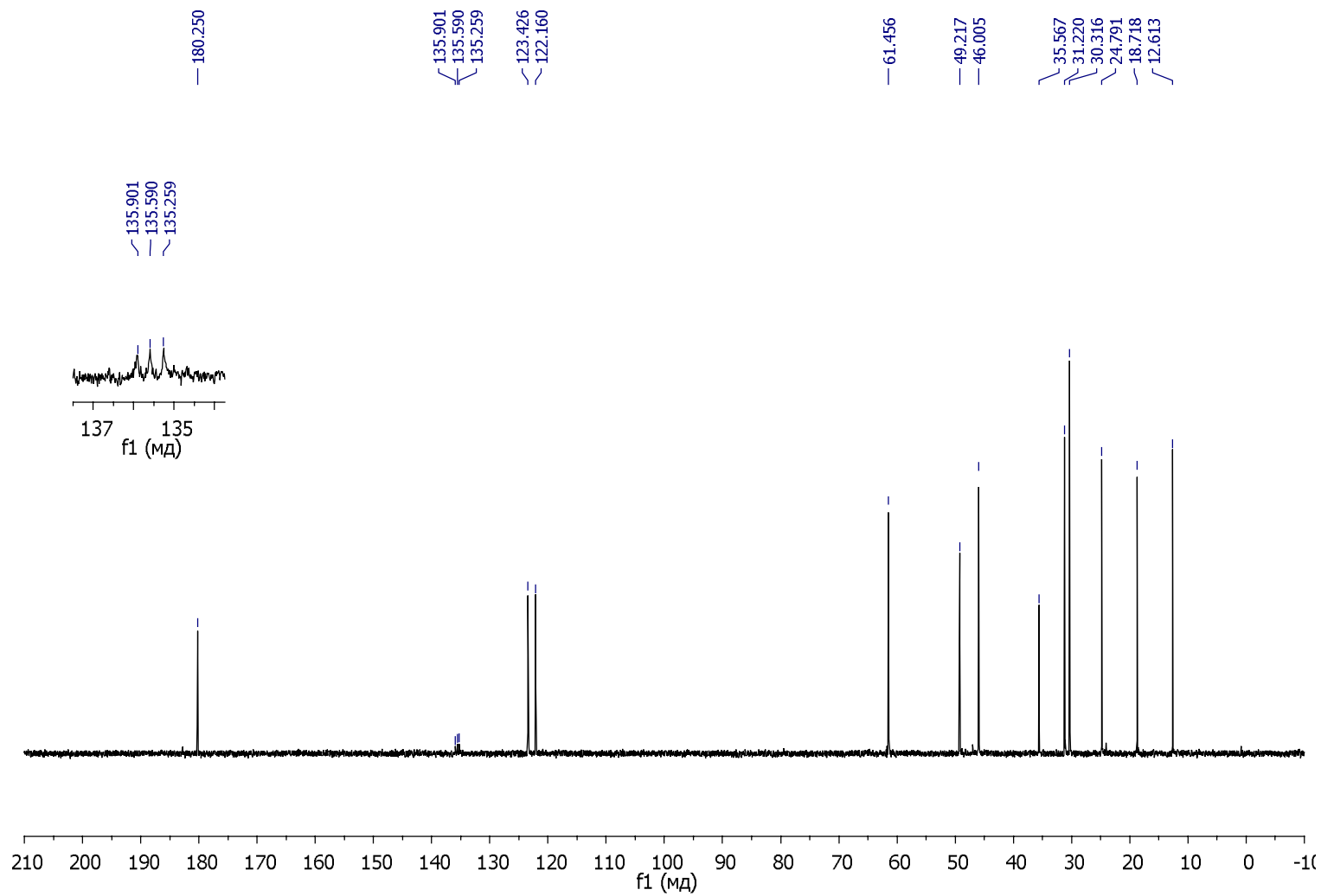


^{13}C ЯМР-спектр $[\text{C}_2\text{MIm}][\text{L-Pro}]$ (D_2O): $\delta = 180.06, 135.64, 123.39, 121.80, 61.44, 46.0, 44.71, 35.54, 30.28, 24.77, 14.44$ ppm.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. ЯМР-спектры [C₄MIm][L-Pro] на ядрах ¹H и ¹³C.

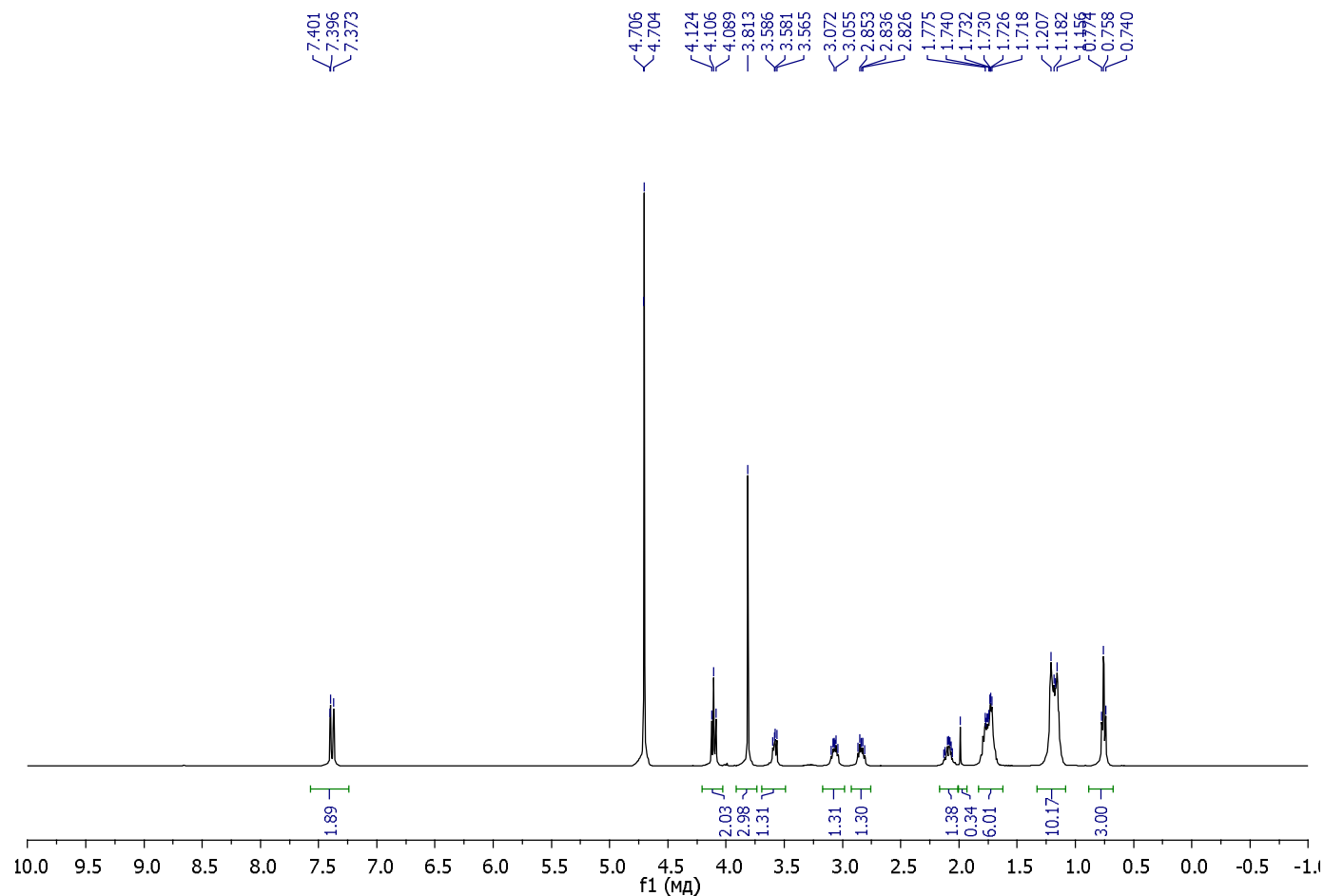


¹H ЯМР-спектр [C₄MIm][Pro] (400 МГц, D₂O): δ = 0.80~0.84 (t, 3H), 1.20~1.22 (m, 2H), 1.69~1.75 (m, 6H), 2.00~2.12 (m, 1H), 2.77~2.80 (m, 1H), 3.01~4.09 (m, 1H), 3.51~3.54 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 4.08~4.11 (t, 2H), 7.33 (d, 1H), 7.38 (d, 1H) ppm.

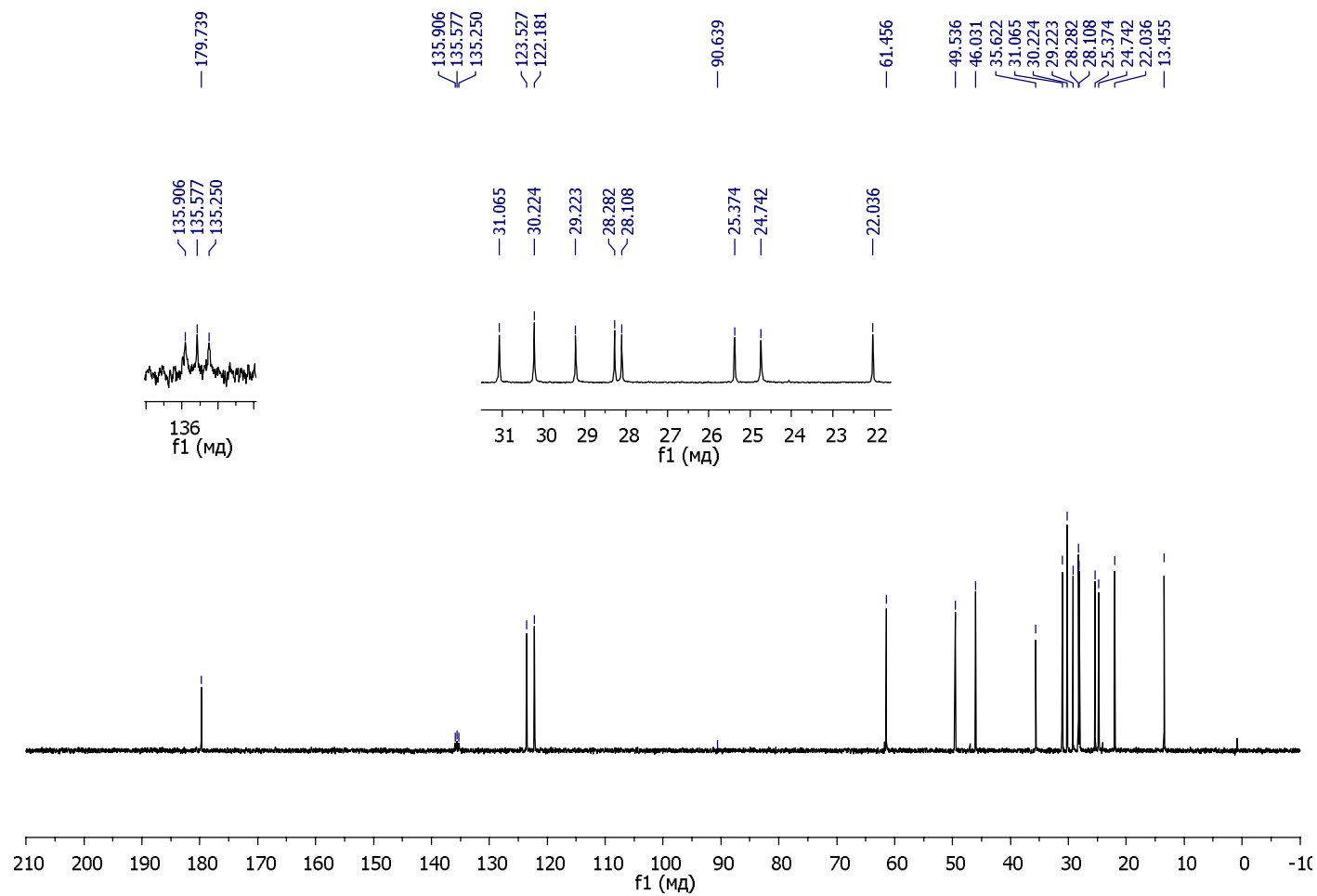


^{13}C ЯМР-спектр $[\text{C}_4\text{MIm}][\text{L-Pro}]$: $\delta = 180.25, 135.59, 123.43, 122.16, 61.5, 49.22, 46.00, 35.57, 31.22, 30.31, 24.79, 18.72, 12.61$ ppm.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3. ЯМР-спектры [C₈MIm][L-Pro] на ядрах ¹H и ¹³C.

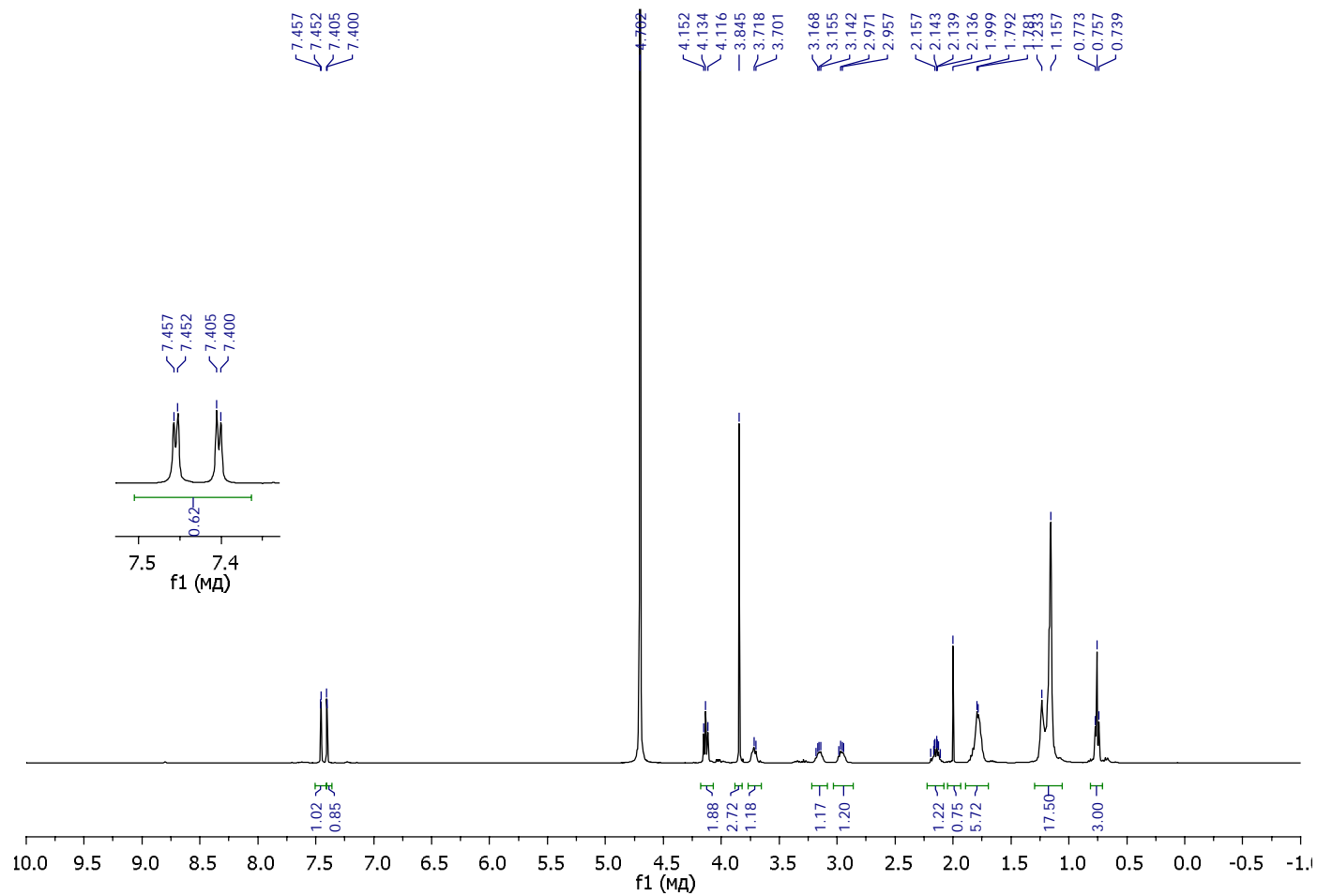


¹H ЯМР-спектр [C₈MIm][L-Pro] (400 МГц, D₂O): δ = 0.74~0.77 (t, 3H), 1.16~1.21 (m, 10H), 1.72~1.78 (m, 6H), 2.05~2.2 (m, 1H), 2.83~2.85 (m, 1H), 3.05~3.07 (m, 1H), 3.56~3.58 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 4.09~4.12 (t, 2H), 7.37 (d, 1H), 7.39 (d, 1H) ppm.

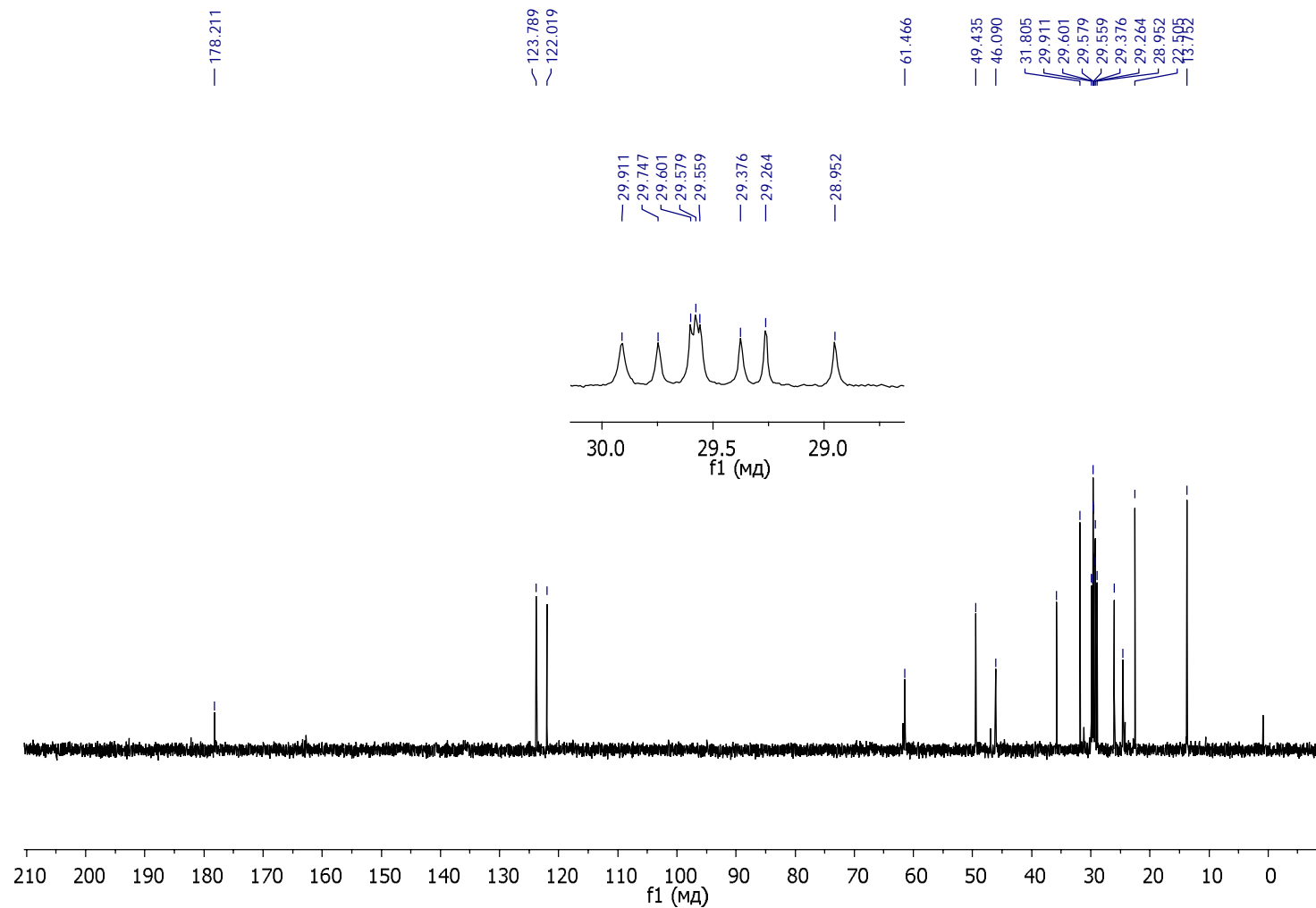


^{13}C ЯМР-спектр $[\text{C}_8\text{MIm}][\text{L-Pro}]$: $\delta = 179.65, 135.03, 123.54, 122.2, 61.5, 49.63, 45.99, 35.65, 31.05, 30.29, 29.14, 28.18, 27.99, 25.31, 24.73, 22.05, 13.43$ ppm.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4. ЯМР-спектры [C₁₂MIm][L-Pro] на ядрах ¹H и ¹³C

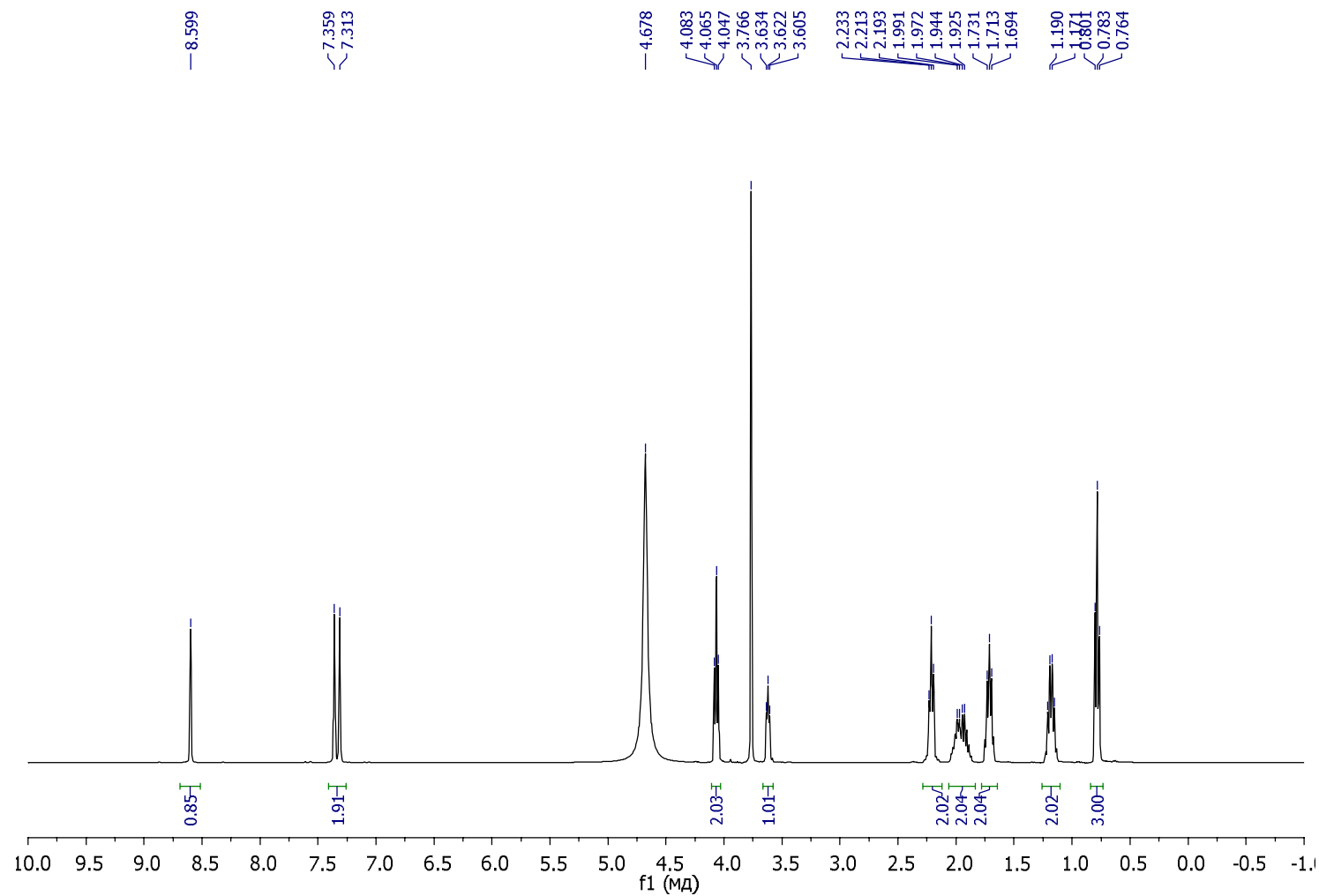


¹H ЯМР-спектр [C₁₂MIm][L-Pro] (400 МГц, D₂O): δ = 0.74~0.77 (t, 3H), 1.15~1.23 (d, 18H), 1.78~1.79 (m, 6H), 2.13~2.17 (m, 1H), 2.96~2.97 (m, 1H), 3.14~3.17 (m, 1H), 3.70~3.72 (m, 1H), 3.85 (s, 3H), 4.12~4.15 (t, 2H), 7.40 (d, 1H), 7.45 (d, 1H) ppm.

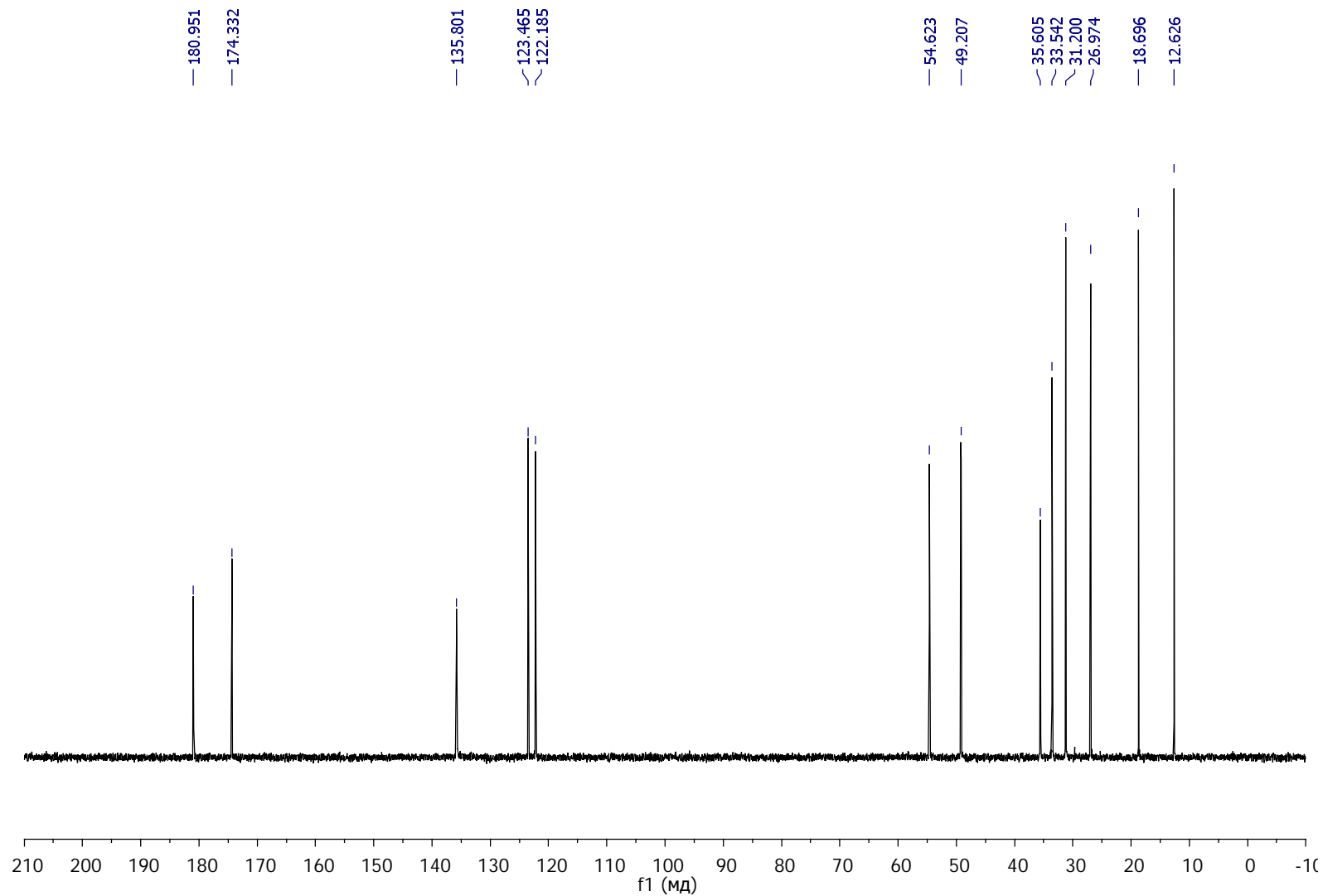


^{13}C ЯМР-спектр $[\text{C}_{12}\text{MIm}][\text{L-Pro}]$: $\delta = 178.21, 135.78, 123.74, 122.01, 61.47, 49.44, 46.05, 35.84, 31.81, 29.91, 29.74, 29.60, 29.58, 29.56, 29.38, 29.26, 28.95, 25.88, 24.73, 22.50, 13.75$ ppm.

ПРИЛОЖЕНИЕ 5. ЯМР-спектры [C₄MIm][L-Glu] на ядрах ¹H и ¹³C.



¹H ЯМР-спектр [C₄MIm][L-Glu] (400 МГц, D₂O): δ = 0.76~0.80 (t, 3H), 1.17~1.19 (q, 2H), 1.69~1.73 (m, 2H), 1.92~1.99 (m, 2H), 2.19~2.23 (m, 2H), 3.61~3.63 (m, 1H), 3.76 (s, 3H), 4.04~4.08 (t, 2H), 7.31 (d, 1H), 7.35 (d, 1H), 8.6 (s, 1H) ppm.



D₂O ¹³C ЯМР-спектр [C₄MIm][L-Glu]: $\delta = 180.95, 174.34, 135.80, 123.47, 122.19, 54.62, 49.27, 35.61, 33.54, 31.20, 26.97, 18.97, 12.63$ ppm.